

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Uku Hämarik

Uurimus hiire Sp140 geenist

Magistritöö

Juhendajad
MSc Mario Saare
PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2014

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1 Sp100 perekonna geeniklaster.....	5
1.2 Sp100 perekonna valkude domeenid ja paiknemine rakus.....	8
1.3 Ekspressioonikohad ja seosed rakusiseste patogeenidega.....	9
1.4 Seosed muude haigustega.....	11
2. Eksperimentaalosa.....	12
2.1 Töö eesmärgid.....	12
2.2 Materjal ja meetodika.....	12
2.2.1 Kloneerimine.....	12
2.2.2 Rekombinantse valgu puhastamine.....	13
2.2.3 Katseloomad ja genotüüpiseerimine.....	14
2.2.4 Immuniseerimine ja kudede kogumine.....	15
2.2.5 ELISA (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>).....	15
2.2.6 Rakusisene tsütokiinide määramine.....	16
2.2.7 Ovalbumiini-spetsiifiliste T rakkude määramine.....	17
2.2.8 RNA eraldamine, cDNA süntees ja qPCR.....	17
2.2.9 3' RACE.....	17
2.2.10 <i>Western blot</i>	18
2.3 Tulemused.....	19
2.3.1 Deletsiooni mõju transkriptile.....	19
2.3.2 SP140 KO hiire immuunrakkude fenotüübi uurimine.....	21
2.3.3 Monoklonaalsete antikehade valmistamine.....	24
2.4 Arutelu.....	25
Kokkuvõte.....	28
Summary.....	29
Kasutatud kirjandus.....	30
Tänuõnad.....	33
Kasutatud veebiadressid ja programmid.....	34
Lisad.....	35
Lihtlitsents.....	37

Kasutatud lühendid

AUAP	<i>abridged universal amplification primer</i> / lühendatud universaalne amplifikatsioonipraimer
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / veise seerumialbumiin
cDNA	komplementaarne DNA
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> / karboksüfluorestseiinsuktsiinimidüülester
Csprs	<i>Component of Sp100-related sequences</i> / Sp100-homoloogsete järjestuste osa
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> / ensüümseoseline immunosorbentmeetod
ENA	<i>European Nucleotide Archive</i>
GST	<i>glutathion S-transferase</i> / glutatiooni S-tranferaas
HSR	<i>homogeneously staining region</i> / homogeenselt värvuv ala
IL-4	<i>interleukin 4</i> / interleukiin 4
KO	<i>knockout</i>
LB	Luria-Bertani sööde
LPS	<i>lipopolysaccharide</i> / lipopolüsahhariid
LRR	<i>long-range repeat</i> / pikem kordusterikas ala
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OVA	<i>ovalbumin</i> / ovalbumiin
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i> / forboolmüristaatatsetaat
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> / cDNA otste kiire amplifitseerimine
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (koekultuurisööde)
Sp140	<i>speckled</i> 140 kDa / tähnilise lokalisatsiooniga 140 kDa valk (Sp110, Sp100 analoogselt)
Ta	<i>annealing temperature</i> / hübridiseerumistemperatuur

Sissejuhatus

Sp100 geeniperekond paikneb paljude imetajate genoomis ühtse lookusena, mille moodustavad perekonna kolm klassikalist liiget (Sp100, Sp110 ja Sp140). Perekonna kõigilt liikmetelt kodeeritakse sarnase domeense ülesehitusega valke, mille funktsioonid on domeenide järgi ennustades seotud kromatiiniga. Kõik neist lokaliseeruvad raku tuumas, kus nad asetsevad erinevates tuumakehades, millest on enim tuntud PML kehad.

Mitmete käsitletavate geenide ekspressioon on immuunsüsteemi rakkudes kõrgenenud, seejuures antud töö uurimisobjekt Sp140 muudes rakkudes ei avaldugi, piirdudes monotsüütide-makrofaagidega, T- ja NK-rakkudega ning omab kõige kõrgemat ekspressioonitaset B-raku alatüüpides. Funktsioonile immuunvastuses viitab ka perekonna liikmete interferoonindutseeritavus ning mitme liikme interaktsioonid erinevate viiruste poolt kodeeritud valkudega. Viimane mõnel juhul pärsib, teisel jälle soodustab viirusinfektsiooni kulgu. Rollile immuunsüsteemi juhitud protsessides viitavad ka ülegenoomsetes assotsiatsioonuuringutes leitud seosed mitme autoimmuunse haigusega (*sclerosis multiplex*, Crohni tõbi) ja B-rakulise leukeemiaga. Tugevaim tõendus funktsioonist immuunsüsteemis on inimestel esinev SP110 defektist tulenev primaarse immuunpuudulikkuse sündroom.

Kõnealuste geenide funktsiooni uurimist raskendab immuunsüsteemi toimimine paljude erinevate rakutüüpide koostööna, mille lahkamine vajab organismi tasemel lähenemist. Klassikalise mudelorganismina oleks sobivaks lähenemisenurgaks hiiremudel, kuid hiire puhul on nende geenide uurimine raskendatud amplifitseerunud genoomipiirkonna tõttu selle lookuse vahetus läheduses. Sellest tingitud lüngad teadaolevas genoomi järjestuses teevad katsete planeerimise keerulisemaks ning kuna korduspiirkond sisaldab palju fragmente uuritavatest geenidest, on raskendatud ka saitsptsüüfilised manipulatsioonid.

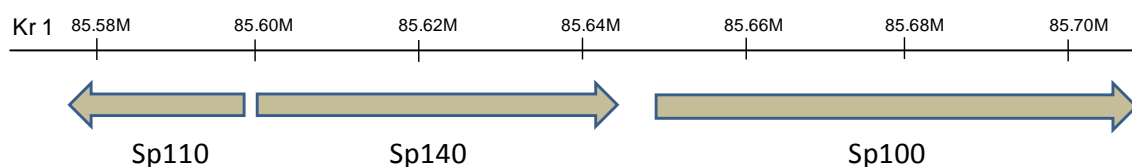
Antud töö teoreetilises osas luuakse ülevaade varasematest töödest, kus on Sp100 geeniperekonna liikmeid uuritud. Eksperimentaalses iseloomustatakse potentsiaalset hiiremudelit Sp140 transkriptide tasemel ning tehakse mõned esialgsed katsed võimaliku fenotüübi leidmiseks. Vajaliku töövahendina luuakse ka hiire Sp140 vastased antikehad. Käesolev töö on tehtud TÜ Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditiini instituudi Molekulaarpatoloogia töögrupis.

Märksõnad: adaptiivne immuunsus, monoklonaalsed antikehad, Sp100 geeniperekond

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Sp100 perekonna geeniklaster

Sp100 geeniperekonna tuumik koosneb alltoodud kolmest geenist – Sp110, Sp140 ning Sp100, millelt kodeeritakse sarnase domeense ülesehitusega valke (joonised 1 ja 2). Taolise üldasetusega on antud lookus paljudes imetajates, kuigi on mõned liinispetsiifilised erinevused. Inimesel on Sp140 ja Sp100 vahel neljas geen Sp140L, mis on tekkinud primaatide evolutsiooni jooksul ebavõrdse meiotilise ristsiirde käigus ja mille promootor ning 5' ots on Sp100 päritolu ning 3' ots Sp140-homoloogne (Saare et al., avaldamata; R. Venta magistr töö, 2008).



Joonis 1. Hiire Sp100 perekonna geeniklastri skeem koos genoomsete koordinaatidega. M – miljon aluspaari (kromosoom 1, koordinaadid GRCm38.p2 järgi).

Selle töö kontekstis on olulisem hiire lookuse eripära, mis seisneb kordusterikka piirkonna (LRR, *long-range repeat*) olemasolus Sp100 geeniklastrist vahetult 5' suunas. Koduhiirel (*Mus musculus*) ja tema lähisugulastel (*Mus spretus*, *Mus spicilegus*, *Mus macedonicus*) on korduspiirkonna pikkus olenevalt hiire päritolust vahemikus 6-200 miljonit aluspaari (Agulnik et al., 1993), perekonna *Mus* vanema haru esindajatel *Mus caroli* ja *Mus cervicolor* see korduspiirkond puudub, mis lubab nende genoomi pidada eellasseisundiks (Traut et al., 2001). LRR pikkus võib varieeruda ka liigi sees ja looduslikes populatsioonides sama geograafilise piirkonna isendite vahel (Winking et al., 1991). Pikemad kordusalad (>20 Mb) on näha tsütogeneetilises värvingus nn homogeenalt värvuva alana (*homogeneously staining region*; HSR) (Kunze et al., 1996), mille järgi see piirkond algselt leiti (Traut et al., 1984). Kuna vastav bänd on C-positiivne, on vähemalt pikema kordusala korral lookus pigem heterokromatiinne (Kunze et al., 1996).

Siinses töös kasutatava C57BL/6 hiire LRR on uuritustest üks lühemaid (Weith et al., 1987), 129S6 liini kohta täpsem info puudub, kuigi Traut et al. (2001) väitel leidub klassikalistes laborihiirtes ainult madala koopiarvuga klastreid. Siiski on referentsgenoomi aluseks oleva C57BL/6 genoomi LRR piirkond piisavalt ulatuslik, et takistada genoomi usaldusväärset

assambleerimist ning hiire genoomi avaldamisest (Waterston et al., 2002) kuni tänaseni (lisa 1) on vastava piirkonna järjestuses lünk. Sellest 5' suunas on kromosoomiga suudetud ühendada ~400 kb jagu korduspiirkonda ning 3' suunas oleva kromosoomiosaga ~100 kb. Lisaks on andmebaasides neli suuremat sellest piirkonnast pärinevat BAC kloon (bakteri tehiskromosoomi; NCBI viitekoodidega NT_166280.1, NT_166281.1, NT_166282.1 ja NT_162750.1) kogupikkusega ~750 kb, mis ei sobi kokku üksteisega ega lünga otstega, millest järeldub, et osa järjestusest on endiselt puudu.

Vanemtüüpi hiire *Mus caroli* amplifikatsioonideta genoomi uurides (Weichenhan et al., 2001) või praeguses Ensembl andmebaasis olevate teiste liikide vastava lookusega võrreldes selgub, et kordusallas on kaasatud neli geeni – Sp100, Sp140, Sp110 ning eellasasetuses neist vahetult 5' suunas asuv Csprs geen (*component of Sp100-related sequences*). Viimane kodeerib teadmata funktsiooniga G-alk seoselist retseptorit. Korduspiirkond algab klassikalisest Sp100 perekonna geeniklastrist vahetult 5' suunas, jättes vanemgeenid ümberkorraldustest puutumata. Sp100 geenist sisaldab kordusala ainult esimest kolme eksonit, kuid sageli järgneb sellele Csprs geen, mida transkribeeritakse Sp100 fragmendi promootorilt lähtuva transkripti osana. Genoomseid ja cDNA järjestusi vastavate vanemgeenidega võrreldes on leitud, et Sp100-homoloogsed osad on kordusallas suuremate mutatsioonideta, kuid Csprs päritolu eksonid on mitmekesiste ümberkorraldustega ning teadaolevalt toimivat Csprs valku LRR klastri ei kodeerita (Weichenhan et al., 2001). Viimast tüüpi transkripte (Sp100 algusega ja varieeruva 3' osaga) on hakatud nimetama Sp100-rs (*Sp100-related sequences*) ning kuna need olid esimesed transkriptid, mille kaudu selle korduspiirkonna kodeeritavat potentsiaali uuriti, nimetatakse vastavat piirkonda ka Sp100-rs klastriks (Weichenhan et al., 1998).

Sp110 (vanemas kirjanduses nimega Ifi75, *Interferon-inducible 75 kDa*) esineb LRR klastris paljude erinevate ümberkorralduste kujul, kuid nende mRNA-d või valku kodeerivat võimet pole lähemalt uuritud. Senini on leitud üks EST (*expressed sequence tag*), mille põhjal eeldatakse Sp110-Csprs liit-transkripti olemasolu (Weichenhan et al., 2001).

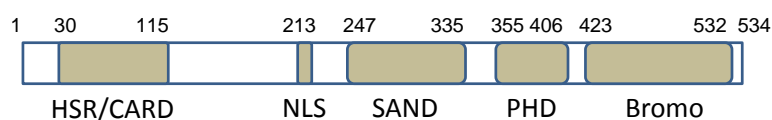
Sp140 geeni osade rolli LRR piirkonna kontekstis ei ole varasemates töödes uuritud, seetõttu toetub järgnev Sp140 analüüs meie töörühma avaldamata tähelepanekutele. Praegu andmebaasides olevate genoomsete järjestuste kohaselt leidub korduspiirkonnas mitmeid 5' otsata Sp140 fragmente (alates 4. või 6. eksonist; eksonite numbrid järgivad joonisel 3 toodud skeemi) ning lühemaid fragmente geeni keskosast, mille funktsionaalsus on kaheldav. Seevastu võivad mingisugust mõju omada mitmed eksoniga 3 või 5 lõppevad Sp140 5'

fragmendid, millelt pärinevad transkriptid (näiteks ENA viitekoodiga AK047983.1) on avalikes andmebaasides saadaval. Kõige rohkem meenutavad tegelikku Sp140 geeni kaks piirkonda (NCBI Gene tähistustega A530032D15Rik ja LOC100041708), millest esimesel puuduvad eksonid 5, 11 ja 12 ning eksoni 16 sees asub 6 kb pikkune insertioon, teisel puudub ekson 5 ning ekson 16 keskelt Sp140-homoloogne järjestus katkeb. Olulise nüansina on mõlemal üheksanda eksoni keskel 7-nukleotiidine deletsioon, mis põhjustab muidu pideva lugemisraami katkemise ja kolme aminohappe järel enneaegse stoppkoodoni tekkimise. Tulemusena on mõlema lookuse puhul täispika transkripti stabiilsus häiritud *nonsense-mediated decay* poolt ning ühel puudub viimane ekson koos transkriptsiooni terminaatorsignaali. Kumbki asjaolu ei takistaks samas lühemate transkriptide avaldumist ning nendelt geenidelt pärinevat alternatiivse kaheksanda eksoniga lõppevat isovormi on ka kohatud (ENA AK040872.1).

Kokkuvõtteks ei sisalda kõnealune korduspiirkond teadaolevalt üheksandast eksonist pikemat lugemisraami, mis tähendaks funktsionaalse Sp140 SAND domeeni ja edasiste valgumotiivide puudumist muudes allikates peale klassikalise Sp140 geeni. Ei saa samas välistada, et mõned promootorita Sp140 fragmendid leiavad uue transkriptsiooni alguse mõne teise geeni fragmendilt, nagu on juhtunud korduspiirkonnas olevate Csprs-päritolu geenikoopiatega. Samuti ei saa eelkirjeldatud kahe pikema Sp140-laadse geeni puhul välistada mutantse eksoni väljasplaissimist, sel juhul puuduks valgust tõenäoliselt toimiv SAND domeen. Välistada ei saa ka funktsionaalse Sp140 geeni esinemist kromosoomi nendes osades, mille järjestus praegu puudub. Korduspiirkonna suurus on C57BL/6 hiirel üritatud hinnata Sp100-rs geeni koopiaarvu järgi, mis leiti *Southern blot* meetodil olevat ~64 koopiat (Traut et al., 1999). Üllatavalt lähedase hinnangu andis ka hiire genoomi sekveneerimise konsortsiumi (MGSC) raport (Waterston et al., 2002), mille kohaselt oli Sp100-rs koopiaarvuks sekveneerimiskatvuse alusel ligi 60 (Waterston et al., 2002). Arvestades, et praegu saada olev genoomne järjestus sisaldab 8-12 Sp100-rs koopiat (vastavalt Sp100 teise ja kolmanda eksoni järgi või Csprs-homoloogse osa järgi), on tegelik korduspiirkonna ulatus hinnanguliselt 5-8x suurem (kokku 6-10 Mb). Võrdluseks on Sp140 CARD ja SAND domeeni koopiaarv saadaolevas kordusala järjestuses vastavalt 11 või 7 koopiat.

1.2 Sp100 perekonna valkude domeenid ja paiknemine rakus

Kõigilt Sp100 perekonna geenidelt kodeeritav pikim isovorm sisaldab joonisel 2 kujutatud valgudomeene – HSR/CARD (*homogenously staining region / Caspase recruitment domain*), ennustatav tuumalokalisatsioonisignaal (NLS), SAND (*Sp100, AIRE-1, NucP41/P75 ja DEAF-1 domeen*), PHD (*plant homeobox domain*) ja Bromodomeen. Inimesel, keda on rohkem uuritud, on enamike geeniperekonna liikmetel leitud ka lühemaid isovorme, mis lõppevad enne SAND või PHD domeeni.



Joonis 2. Hiire täispika SP140 valgu domeenide paigutus koos aminohappeliste koordinaatidega. Domeenide nimetused seletatud tekstis.

HSR/CARD domeen vahendab oligomeriseerumist (Negorev et al., 2001) ning esialgse nime HSR sai ta hiire korduspiirkonna järgi, milles on amplifitseerunud seda domeeni sisaldavad Sp100 esimesed eksonid. Peale Sp100 perekonna geenide leidub HSR domeen ainult Aire (*autoimmuunregulaator*) geenis, milles sisalduvad SAND ja PHD domeenid viitavad evolutsioonilisele seotusele Sp100 perekonna geenidega. Hiljem on täheldatud, et struktuuriennustuste poolest meenutab HSR domeen paljudes geenides leiduvat di- või trimeriseerumist vahendavat CARD domeeni (Ferguson et al., 2008).

SAND domeenil on mitme geeni puhul kirjeldatud madala spetsiifikaga DNA-seonduvat võimet (Bottomley et al., 2001; Isaac et al., 2006; Surdo et al., 2003) ning inimesel leidub teda lisaks Sp100 perekonna ja Aire geenidele veel ainult kahes geenis (NUDR / *Nuclear DEAF-1 related* ja GMEB / *Glucocorticoid Modulatory Element Binding*).

PHD ja Bromodomeen on enim tuntud histoonidega seonduvate motiividena, mille ligandiks üldjuhul mõni histooni N-terminaalses sabas asuv lüsiin (ülevaade Taverna et al., 2007). Oluline on ka lüsiini modifikatsioon, mis PHD puhul võib olla metülatsioon või modifikatsiooni puudumine (Org et al., 2008), harvemal juhul ka atsetüleerimine (Zeng et al., 2010); Bromodomeeni seondumiskohaks on atsetüleeritud lüsiinid (Taverna et al., 2007). Inimese Sp140 PHD domeeni interaktsioone on üritatud erinevate histoonipeptiididega uurida, kuid seondumist pole leitud ning mõningad struktuursed iseärasused võrreldes teiste

PHD domeenidega lubavad oletada, et ta ei pruugi histooniga seonduda nagu senituntud PHD domeenid (Zucchelli et al., 2014).

Viimased kolm valgumotiivi (SAND, PHD ja Bromodomeen) viitavad vastavate valkude osalemisele kromatiiniga seotud protsessides, näiteks transkriptsioonis, replikatsioonis või DNA kahjustustele reageerimises. Mõju transkriptsioonile on uuritud GAL4-vahendatud reportersüsteemis ning erinevatel valkudel on leitud vastupidine mõju – Sp100A mitmed isovormid represseerisid reportergeeni (Bloch et al., 1999; Lehming et al., 1998; Seeler et al., 1998), kuid Sp110 ja Sp140 seevastu aktiveerisid (Bloch et al., 1999, 2000).

Kõik Sp100 perekonna valgud lokaliseeruvad tuumas punktlaadsete kogumitena, millest nad on saanud ka oma nimetuse (Sp – *speckled*). Sp100 kolokaliseerub seejuures PML (*promyelocytic leukemia*) valgu ja vastavate PML tuumakehadega (Guldner et al., 1999), milles asuvad valgud on seotud väga paljude protsessidega alates transkriptsioonist, apoptoosi või rakutsükli reguleerimisest kuni viirusnakkustele või DNA kahjustustele reageerimiseni (Lallemant-Breitenbach ja de Thé, 2010). Seetõttu annab PML kehas lokaliseerumine valgu funktsiooni kohta üsna vähe infot. Osade valkude puhul loob tuumakehades asumine sobiva mikrokeskkonna posttranslatsiooniliste modifikatsioonide lisamiseks (Carracedo et al., 2011), teiste puhul toimivad tuumakehad mobiilse depooni, kust vastavaid valke vajadusel vabastada saab (Lallemant-Breitenbach ja de Thé, 2010).

Sp110 on näidatud mõnes olukorras PML kehasse kuuluvat, mõnes jällegi mitte, tõenäoliselt käitub ta erinevates rakutüüpides erinevalt ning lokaliseerumine võib sõltuda muude valgulistest faktoritest olemasolust või kättesaadavusest, millega interakteerudes Sp110 tuumakehadesse lokaliseeruks (Bloch et al., 2000). Sp140 kohta on info sama vastukäiv, kuna mõnel juhul on teda nähtud PML valguga kolokaliseeruvat (Bloch et al., 1996) ning mõnel teisel jällegi mitte (Dent et al., 1996).

1.3 Ekspressioonikohad ja seosed rakusiseste patogeenidega

Inimese ekspressiooniandmebaasi Genevestigator (www.genevestigator.com/gv) järgi on käsitletavatest geenidest kõige laialdasemalt ekspresseeritud Sp100, mida leidub enamikes kudedes või rakutüüpides üsna lähedasel tasemel. Sp110 on pisut leukotsüüdispetsiifilisem, kuna ta avaldub paljudes rakutüüpides arvestataval tasemel, kuid märksa kõrgemalt T- ja B-raku alatüüpides ning monotsüüt/makrofaag liinis (Genevestigator; Bloch et al., 2000). Sp140 avaldumismuster on veelgi spetsiifilisem, kuna ta mittehematopoeetilist päritolu rakkudes ei avaldu, keskmisel tasemel avaldub T-raku alatüüpides, NKT rakus ja monotsüüt/makrofaag liinis ning kõige kõrgemalt B-raku alatüüpides (plasmarakk, idutsentri või mälu B-rakk)

(Genevestigator; Bloch et al., 1996). Sp140 B-raku spetsiifilisust kinnitab ka hiire ekspressiooniandmestik ImmGen andmebaasis (www.immgen.org). Sp100 perekonna geenide ekspressioon tõuseb vastavate rakutüüpide *in vitro* diferentseerimisel (Bloch et al., 2000, 1996) ning nii I kui ka II tüüpi interferoonide stimulatsiooni korral (Bloch et al., 1999; Guldner et al., 1992; Kadereit et al., 1993). Vastavalt on kõigi inimese Sp100 perekonna geenidel katseliselt näidatud või bioinformaatsiliselt ennustatud regulaatorelemendid tüüp I ja tüüp II interferoonide, NF- κ B, Ap-1 ja Sp1 seondumise jaoks (Grötzinger et al., 1996; R. Venta magistritöö, 2008).

Sp100 perekonna geenide interferoonindutseeritavus ja paiknemine tuumakehades, millest vähemalt PML kehael on kirjeldatud interaktsiooni viirustega (Ishov ja Maul, 1996), viitab Sp100 perekonna osalusele viirusvastastes protsessides. Mitmel juhul on kirjeldatud ka viiruste interaktsioone Sp100 perekonna valkudega. Näiteks Sp100 pikemad isovormid repressseerivad HSV-1 (*herpes simplex virus 1*) lüütiliseks infektsiooniks vajalike faktorite ekspressiooni (Negorev et al., 2006) ning lüütilise infektsiooni käivitumisel Sp100 sumoüleeritud isovormid lagundatakse viiruse valkude poolt ubiquitineerimise teel. Teiste alfa herpesviiruste ortoloogsed valgud omavad sarnast funktsiooni (Everett ja Chelbi-Alix, 2007). Samas võib mõni viirus kasutada Sp100 perekonna valke enda kasuks, näiteks Sp100 lühem isovorm võimendab Epstein-Barr viiruse EBNA-LP (*Epstein-Barr virus nuclear antigen leader peptide*) funktsiooni koaktivaatorina B-raku immortaliseerimise käigus (Ling et al., 2005). Epstein-Barr viirus kasutab veel üht Sp100 perekonna liiget, nimelt viiruse valk SM seondub Sp110 lühema isovormiga ning see võimaldab tal lüütilise faasi transkriptide stabiilsust tõsta, lisaks võimendab SM valk ka Sp110 ekspressiooni (Nicewonger et al., 2004). Siinse töö seisukohalt oluline Sp140 leiti *yeast two-hybrid* meetodil HIV Vif valgu interaktsioonipartnerina ning näidati, et selle interaktsiooni tagajärjel toimub Sp140 tuumast välja viimine, kuid selle protsessi mõju viirusinfektsiooni kulgemisele ei ole demonstreeritud (Madani et al., 2002).

Sp110 näitel on teada, et Sp100 perekonna geenid võivad omavada funktsiooni ka mitteviiruslike infektsioonide korral. Erinevate hiireliinide võrdlusel on leitud Sp100 geeniklastrit hõlmav kromosoomi piirkond, mis osadel hiireliinidel tingis vastuvõtlikkuse *Mycobacterium tuberculosis* ja *Listeria Monocytogenese* nakkusele. Vastuvõtlikel hiirtel oli Sp110 ekspressioon puudulik ning vastuvõtlikkus nakkusele oli pööratav toimiva Sp110 transgeeni ekspresseerimisega, millest järeldus Sp110 roll tuberkuloosivastases tegurina (Pan et al., 2005).

1.4 Seosed muude haigustega

Inimestel on SP110 geeni puudulikkusega seotud üks monogeenne haigus, retsessiivne primaarne immuunpuudulikkuse sündroom VODI (*veno-occlusive disease with immunodeficiency*). Varases eas letaalse sündroomiga kaasnevad oportunistlikud infektsioonid, hüpogammaglobulineemia, kombineeritud B- ja T-rakuline immuunpuudulikkus ning idutsentrite ja plasmarakkude puudumine. Samal ajal esineb venooklusiivne maksakahustus, kuid pole teada kuidas see immuunpuudulikkusega seotud on (Roscioli et al., 2006).

Sp140 geeni puhul on inimestel leitud ülegenoomsete assotsiatsioonuuringutes temas leiduvate polümorfismide seos kroonilise lümfoidse leukeemia (Di Bernardo et al., 2008), *sclerosis multiplex*'i (Sawcer et al., 2011) ja Crohni tõvega (Franke et al., 2010). Eeltoodud uuringute suurima olulisusega polümorfismid asuvad kõik mittekodeerivates alades ning nad üksteisega tugevalt aheldunud. Kroonilise leukeemia assotsiatsioonuuringus leitud SNP asukohas on ENCODE genoomibrauseri (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) järgi seondumiskoht mitmetele transkriptsioonifaktoritele, nende seas ka tuntud faktor IRF4, mis leiti samas uuringu kõige tugevana leukeemiaseoselise geenina. Sama Sp140 polümorfismi puhul demonstreeriti nõrka Sp140 ekspressioonitaseme langust (Di Bernardo et al., 2008), kuid hilisemates metauuringutes on see efekt olnud marginaalselt oluline (Sillé et al., 2012). Seevastu on hiljem leitud eelmiste SNP-dega aheldunud polümorfism ühes CARD ja SAND domeeni vahelist ala kodeerivas eksonis, mille puhul SNP mõjutas eksoni väljasplaissimist (Zhao et al., 2013). Kokkuvõttes on uuringutes leitud SNP-de puhul ebaselge, milline on leitud seostes põhjuslik polümorfism. Samas näitab Sp140 geeni seotus mainitud patoloogiaga, et hoolimata sarnase ülesehitusega sugulasgeenide olemasolust pole Sp140 gene redundantne.

Lisaks on mõnede SP100 perekonna valkude ühisjooneks nende vastaste autoantikehade esinemine primaarse biliaarse maksatsirroosi patsientidel. Kõige klassikalisemad taoliste markerite seas on SP100 ja PML, hiljuti on näidatud ka SP140 (Granito et al., 2010) ja SP140L (Saare et al., avaldamata) vastaste autoantikehade olemasolu. Pole teada, kuidas nende teke patoloogiaga seotud on.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Paljudes immuunsüsteemi rakkudes ekspresseeruva geenina on Sp140 funktsiooni *in vitro* keeruline uurida, kuna protsessid, milles ta potentsiaalselt osaleb, vajavad sageli erinevate rakkude koostoimet ning erinevates kudedes või organites olevate rakkude diferentseerumise etappe. Sel põhjusel kasutatakse immunoloogias laialdaselt loommudeleid, kuid Sp140 puudulikku hiirt poldud siiani loodud. Koostöös TÜ Transgeense tehnoloogia tuumiklaboriga konstrueeriti Sp140 *knock-out* hiireliin, mille kirjeldamisega antud töös algust tehakse. Lisaks oli vaja luua hiire Sp140 valgu vastased antikehad, mis on paljudeks molekulaarbioloogilisteks uuringuteks hädavajalikud.

Eelnevast lähtuvalt olid töö konkreetsemad eesmärgid:

- kinnitada potentsiaalsete Sp140 ekson 9 ja 10 deletsiooniga hiirte fenotüüp RNA tasemel ning uurida deletsiooni mõju transkriptidele
- koguda esmased andmed deletsiooni mõjust B- ja T-rakkude funktsioonile
- teha hiire SP140 vastased monoklonaalsed antikehad

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kloneerimine

Hiire Sp140 aminohappeid 109-251 sisaldava antigeeni GST-Ag109-215 tootmiseks kasutatava ekspressioonikonstrukti kloneerimiseks amplifitseeriti vajalik fragment PCR-iga, kasutades matriitsina C57BL/6 hiire põrna cDNA-d, spetsiifilisi praimereid (tabel 1) ja ensüümi Phusion HF tootja protokoll järgi (Thermo): Ta 60 °C, elongatsioon 10 sek, 35 tsükli. PCR produktid puhastati NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel) kolonnil, restrikteeriti BamHI ja NotI ensüümidega tootja protokoll järgi (Fast Digest, Thermo) ja puhastati 1% agarosgeeli ja NucleoSpin kolonniga. Saadud fragmendid ning analoogselt lõigatud vektor pGEX-4T1 (kingitus Kalle Saksela käest, Helsingi ülikool) lüüsi T4 ligaaasi abil vastavalt tootja protokollile (Thermo), transformeeriti NovaXG (Novagen) kompetentidesse ning kasvatati karbenitsilliiniga (siin ja edaspidi 50 µg/ml) LB tassil 16 h 37 °C juures. Plasmidset DNA-d paljundati üksikkolooniast kasvatatud bakterikultuuris (LB + karbenitsilliin, 16h 37 °C) ning puhastati DNA Nucleobond 500 kolonnil (Macherey-Nagel). Konstrukti õigsust kontrolliti restriksiooni ja sekveneerimisega Eesti biokeskuse tuumiklaboris.

Tabel 1. Töös kasutatavate praimerite järjestused

Rakendus	Nimi	Järjestus
genotüpiseerimine	gF	AAAGCCACTTTGAGTGGACGAC
	gR1	CCTCAGAGGCTGAACACATTC
	gR2	TCCCTTCAAGTTACCACACGTC
	ex12R	GAACGATGCAAGTTCTGTGTTCTC
kloneerimine	antigeen_F	TTTGGATCCTACCCCGACTTAAAGGAGACTC
	antigeen_R	TTTGCGGCCGCTCAGGGTTTTCTTGCAGGAATGTTCC
	m140_FL_F	TTTGAATTCATGGCAGGAGGCTACAATGAACTC
	m140_FL_R	TTTGGTACCACTCTTTTCATTTGTTTCCTGAATAG
qPCR	ex5F	GAAGTAATTCTTGTGAACAAACAAGACAAACAAGAC
	(ex7R)	(sama mis antigeen_R)
	ex8R	GTTTTGACCAGTTGTGGCCTTTC
	ex9R	ACCACACGTCACGGGAAGCAAC
	HPRT_F	CTCTCGAAGTGTGGATACAG
	HPRT_R	ACAAACGTGATTCAAATCCC
3' RACE	AP-dT	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
	(SP140 ex5F)	(sama mis qPCR ex5F)
	(HPRT_F)	(sama mis qPCR korral)

Hiire täispika Sp140 kloneerimine teostati analoogselt, kasutades matriitsina sama cDNA-d, spetsiifilisi praimereid (tabel 1), PCR tingimusi Ta 57 °C, elongatsioon 1 min, 35 tsükli. PCR produkt viidi restriктаaside EcoRI ja KpnI abil pFlag-CMV-5a (Sigma) vektorisse. Saadud kloonil pFlag-Sp140Δ74 puudub 74 nt bromodomeenis asuvast 15. eksonist ning raamist välja minnes järgneb ühe aminohappe järel stoppkoodon (Flag *tag*'i ei kodeerita).

2.2.2 Rekombinantse valgu puhastamine

GST-Ag109-215 valgu tootmiseks kasvatati transformeeritud XL-1 Blue (Stratagene) rakke 1 l LB + karbenitsilliin söötmes, OD=0,6 juures lisati 0,4 mM ITPG ning 4 h järel bakterimass sadestati (15 min 6000 g). Sade suspendeeriti 50 ml puhvris 150 mM NaCl + 100 mM Tris (pH 8), lisati 100 µg/ml lüsotsüümi ning inkubeeriti 20 min jääl. Seejärel lisati 0,5 mM DTT, 1x proteaasi inhibiitorite segu (#78437, Thermo) ja 1% sarkosüül ning sonikeeriti 2x 30 sek (võimsus 47%, sagedus 7, Sonopuls HD 2070, Bandelin) ning tsentrifuugiti 15 min 14000 g juures. Supernatandile lisati 10 ml 10% Triton X-100 ja inkubeeriti 10 min jääl, seejärel lisati 700 µl glutatioon-sefaroos keraid (GE Healthcare) ning inkubeeriti 1 h 4 °C juures aeglase pöörlemisega, mille järel kerad sadestati (5 min 300 g) ning pesti 3x 30 ml PBS + 0,1% Triton

X-100 puhvriga. Seondunud valgud elueeriti 2 ml puhvriga 100 mM Tris (pH 7,5) + 600 mM NaCl + 2 M urea + 10 mM glutatioon + 0,3% NP-40, dialüüsi 30 min 4 °C juures (Spectra/Por 3, MWCO 3500, Spectrum Labs) 40 mM Tris (pH7,5) + 300 mM NaCl + 1 M urea + 0,2% NP-40 vastu ning teist korda 4 h 4 °C juures PBS-i vastu, kontsentreeriti Amicon Ultra 30K kolonnil (Millipore) ning kvantiteeriti Coomassie R-250 värvitud SDS-polüakrüülamiidgeelis (0,1% SDS, 12% akrüülamiid (pH 8,8); eel-lahutus 5% geelis (pH 6,8)) BSA (veise seerumialbumiin) standardi suhtes. Saadud ~3 mg valku kasutati BALB/c hiirte immuniseerimiseks Sp140 antigeeniga ja hübriidomide reaktiivsuse esmaseks skriinimiseks (Erkki Juronen, TÜ Bio- ja siirdemeditiini instituut).

2.2.3 Katseloomad ja genotüüpiseerimine

Töös kasutatavad Sp140 9. ja 10. eksoni KO hiired loodi TÜ Transgeneense tehnoloogia tuumiklaboris homoloogilise rekombinatsiooni teel 129S6/SvEvTac päritolu ES-rakkudes, mis seejärel mikroinjekteeriti C57BL/6 blastotsüsti ning siirdati CD1 hiirde. Sünninud kimäärid ristati C57BL/6 hiirtega, saadud B6;129S6 segataustal hiired genotüüpiseeriti (allpool) ning olid rajajateks järgnevatele põlvkondadele. Katsegruppide kasutati heterosügootide ristamisel saadud pesakonnakaaslasti. Töös esitletavate katsegruppide koosseisud on toodud tabelis 2. Katseloomi hoiti TÜ arstiteaduskonna Biomeedikumi vivaariumis ning töö tehti Põllumajandusministeeriumi Loomkatsete läbiviimise loakomisjoni loa nr. 97 alusel.

Genotüüpiseerimine toimus ca 10 päeva vanuste hiirte sabaproovist, millest DNA puhastati GeneJET Genomic DNA Purification Kit abil tootja protokoll kohaselt (Thermo) ning analüüsiti PCR meetodil, kasutades primereid gF + gR1/gR2 (tabel 1) ning FirePol Taq polümeraasi (Solis Biodyne; tavaprotokoll järgi, Ta 58 °C, elongatsioon 1 min, 35 tsüklit) ning PCR produktid lahutati 0,5 µg/ml etiidiumbromiidiga 1% agarosgeelis.

Joonisel 4 toodud cDNA pealt teostatud PCR viidi läbi primeritega ex5F + ex12R (tabel 1) ning FirePol Taq polümeraasi abil (Solis BioDyne; Ta 60 °C, elongatsioon 1 min, 35 tsüklit). KO PCR produkt puhastati NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kolonnil (Macherey-Nagel) ning kontrolliti sekveneerimise teel Eesti Biokeskuse tuumiklaboris.

Tabel 2. Töös kasutatavate katsegruppide koosseisud

Vanus katse lõpus	WT + OVA	KO + OVA	(WT + KO) m.i.	Joonised
4 kuud	5	6	6	6, 7
12 kuud	7	7	4	5, 8, Lisa 2, Lisa 3

OVA – ovalbumiin-immuniseeritud, m.i. – mitteimmuniseeritud.

2.2.4 Immuniseerimine ja kudede kogumine

Immuniseerimine teostati intraperitoneaalse süstiga isofluoraananesteesias hiire alumisse paremasse kvadranti 26 G nõelaga 150 µl immuniseerimisseguga (20 µg ovalbumiini (Sigma #A5503) + 10 µl Alhydrogel® 2% (Invivogen) + 9 µg CpG (ODN 2395, Hycult Biotech #HC4041) + 1/10 PBS 150 mM NaCl-s), negatiivne kontrollgrupp (ovalbumiini-mitteimmuniseeritud) sai samasuguses koostises süsti ilma ovalbumiinita. Tehti kolm süsti kahenädalaste vahedega ning katse lõpetati nädal pärast viimast immuniseerimist. Lisas 3 toodud joonise jaoks võeti kahe viimase immuniseerimise ajal sabaveenist 10 µl verd, lahjendati 500 µl puhver A-s (PBS + 0.5% BSA + 0.05% Tween-20), rakud sadestati 5 min 500 g ning supernatant säilitati hilisemaks analüüsiks.

Katse lõppedes hiired hukati tservikaalse dislokatsiooni teel. Seerumi kogumiseks avati rinnaõõs, süstiti südamesse 20 µl hepariini, tehti südamesse sisselõige ning lasti verel rinnaõõnde koguneda. Seejärel koguti sealt sama nõelata süstlaga veri 1,5 ml tuubi, lasti 30 min toatemperatuuril seista, sadestati 5 min 500g juures, tõsteti seerum uude tuubi ja säilitati hilisemaks analüüsiks. Põrn eraldati avatud kõhuõõnest ning asetati jääle PBS-ga tuubi kuni edasise töötlemiseni. Splenotsüütide eraldamiseks põrn purustati 100 µm rakufiltril (#352360, BD Biosciences) 5-ml süstla kolbiga, pesti 10 ml RPMI:PBS 1:1 (sadestamine 5 min 300 g), erütrotsüüdid lüüsi 5 min toatemperatuuril ACK puhvris (155 mM NH₄Cl + 10 mM KHCO₃), rakud pesti 3 x 10 ml RPMI:PBS, loendati ning hoiti järgneva etapini jääl. Luuüdi koguti sääreluust PBS-ga läbipesemise teel.

2.2.5 ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

IgG kogutase seerumites mõõdeti Mouse IgG total ELISA Ready-SET-Go abil tootja protokoll järgi (eBioscience).

Ovalbumiini vastaste IgG antikehade tiitri mõõtmiseks kaeti 96 auguga plaat (Greiner Bio-One #675061) 2 µg/ml ovalbumiiniga (#A5503, Sigma) 50 µl (siin ja edaspidi maht augu kohta) 50 mM karbonaatpuhvr (pH 9,5) 16 h 4 °C juures ning inkubeeriti 1 h toatemperatuuril 125 µl blokeerimispuhvr (PBS + 1% BSA (#A8022, Sigma) + 0.1% Tween-20). Pärast kahte pesu (150 µl, PBS + 0.05% Tween-20) inkubeeriti plaate puhvr A (PBS + 0.5% BSA + 0.05% Tween-20) lahjendatud seerumitega (lõpplahjendus plaadil 1:100000 mahus 50 µl; varasemate ajapunktide jaoks otsiti sobivamad lahjendused (lisa 3)) kahes korduses 2 h toatemperatuuril. Pärast nelja pesu lisati 50 µl sekundaarset antikeha HRP α-mIgG (total) lahjenduses 1:20000 puhvr A (#115-035-164, Jackson ImmunoResearch) ning 1 h inkubatsiooni ja nelja pesu järel lisati substraatlus (0,1 mg/ml 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiin (#T2885, Sigma) + 0,03 % H₂O₂ + 1% dimetüülsulfoksiid 30 mM

tsitraatpuhvril (pH 4,1)). Ligi 15 min inkubatsiooni järel lisati stopplahus (50 µl 1 M H₂SO₄), mõõdeti OD₄₅₀ ja OD₆₂₀ (Multiskan MCC/340) ning edasiseks väljundiks võeti OD₄₅₀-OD₆₂₀. Standardina kasutati igal plaadil varasemast ovalbumiin-immuniseeritud katsegrupist saadud seerumilahjendust, millest tehti siin mõõdetud plaatidele kahekordse sammuga lahjendusrida, mille alusel tehti regressioonsirge ning selle abil väljendati mõõdetavad proovid standardi suhtes. Kui mõni mõõdetav proov oli väljaspool usaldusväärsset (lineaarset) mõõtepiirkonda, korrati mõõtmist sobivamal lahjendusel. Tulemused arvatati kahe tehnilise korduse keskmisena.

Ovalbumiini vastaste IgG antikehade aviidsuse hindamise ELISA teostati nagu tiitri määramisel, erinedes proovide korduste poolest (neli) ja lahjenduste osas (proovidest oli tiiter varem mõõdetud ja plaadile kanti lahjendus, mis annaks standardi ülemisse ossa langeva mõõtetulemuse) ning pärast seerumite inkubatsiooni (enne sekundaarse antikeha lisamist) inkubeeriti kahte kordust 1,5 M guanidiin-HCl (pH 6,4) keskkonnas 15 min toatemperatuuril ning nelja pesu järel lisati sekundaarne antikeha ja jätkati nagu tiitri mõõtmisel. Tulemused väljendati aviidsuskoefitsiendina (AK), mis arvatati iga seerumi puhul fraktsioonina antikehadest, mis Gu-HCl dissotsieerivatel tingimustel seotuks jäid.

2.2.6 Rakusisene tsütokiinide määramine

10⁶ splenotsüüti inkubeeriti 24 auguga koekultuuriplaadil (#662 160, Greiner Bio-One) 1 ml täielikus söötmes (RPMI (#E15-842, Naxo) + 10% termiliselt inaktiveeritud veise loote seerum + 2 mM L-glutamiin + 100 U/ml penitsilliin + 100 µg/ml streptomütsiin (kõik PAA) + 50 µM 2-merkaptotanol) 20 ng/ml forboolmüristaatatsetaadi (PMA) + 1.5 µg ionomütsiini (mõlemad Sigma) keskkonnas 6 h 37 °C, 5% CO₂ juures, neist viimased 3 h 10 µg/ml brefeldiin A (Sigma) juuresolekul. Rakud pesti 2x 2ml RB puhvriga (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA, sadestamised siin ja edaspidi 5 min 300 g, 4 °C) ning jagati kahte ossa. Esimene märgistati antikehadega αCD4-FITC (1:100, #100510, BioLegend) + αCD8-eFluor650NC (1:75, #95-0081-42, eBioscience) + αCD44-PerCP-Cy5.5 (1:400, #45-0441-82, eBioscience) + αIFNγ-PE-Cy7 (1:100, #25-7311-82, eBioscience) + αIL-17-PE (1:50, #559502, BD Pharmingen) ning teine antikehadega αCD4-FITC + αCD44-PE (1:200, #103007, BioLegend) + αIL-4-PE-Cy7 (1:100, #25-7042-42, eBioscience) + αIL-10-APC (1:100, #17-7101-81, eBioscience). Esmalt märgistati pinnamarkerid (CD4, CD8, CD44; 96 auguga koekultuuriplaadil 75 µl FcR-blokeeriva 2.4G2 hübridoomi söötmes, 30 min jään), 3x 200 µl RB pesu järel inkubeeriti 20 min 200 µl fikseerimispuhvril ning pesti 2x 200 µl permeabiliseerimispuhvriga (mõlemad Foxp3 Staining Buffer Set, #00-5523-00, eBioscience), seejärel märgiti rakusisesed tsütokiinid (IFNγ, IL-17, IL-1, IL-10; 50 µl

permeabiliseerimispuhvris, 30 min jääl), pesti 2x 200 µl permeabiliseerimispuhvri ja 3x 200 µl RB puhvriga ning analüüsiti voolutsütomeetril (5 laseriga LSR Fortessa, BD Biosciences).

2.2.7 Ovalbumiini-spetsiifiliste T rakkude määramine

2×10^6 splenotsüüti märgistati 5 µM karboksüfluorestseiinsuktsiinimidüülestriga (CFSE; Molecular Probes) 1ml PBS-s 5 min toatemperatuuril, pesti 5x 1ml täielikus RPMI söötmes ning kanti 24 auguga koekultuuriplaadile (#662160, Greiner Bio-one) 1 ml täielikus RPMI söötmes, kuhu lisati 100 µg/ml ovalbumiini (#A5503, Sigma) ning inkubeeriti 5 päeva 37 °C, 5% CO₂ juures. Seejärel märgistati rakud antikehadega αCD4-APC (1:400, #553051, BD Pharmingen) + αCD44-PerCP-Cy5.5, pesti 3x 200ul RB puhvris ning analüüsiti voolutsütomeetriliselt (detailid analoogselt eelmisele punktile). Lisas 4 toodud katses lisati ka OVA-mittestimuleeritav kontroll.

2.2.8 RNA eraldamine, cDNA süntees ja qPCR

10^6 rakku lüüsi 0,5 ml TRIzol-iga (Invitrogen), millele lisati 100 µl kloroformi, segati põhjalikult, inkubeeriti 5 min toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 15 min 13000 g. Seejärel eraldati vesifaas, millele lisati 0,5 µl glükokeeni (20 mg/ml), lisati võrdne maht isopropanooli, sadestati 15 min 11000 g, pesti 0,5 ml 75% EtOH-ga ja RNA sade lahustati 12 µl vees ning RNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop 2000c instrumendil (Thermo). cDNA sünteesiks lisati 1 µg RNA-le 0,5 µg oligo-(dT)₁₈ praimerit (Invitrogen) ja 1 µl 10 mM dNTP segu kogumahuks 12 µl, inkubeeriti 5 min 65 °C juures ning seejärel >1 min jääl. Reaktsiooni alustamiseks lisati 4 µl 5x First Strand puhvrit, 1 µl 0,1M DTT, 1 µl ribonukleaaside inhibiitorit RiboLock (Thermo) ja 1 µl SuperScript III ensüümi (Invitrogen) ning inkubeeriti 60 min 50 °C juures ning ensüüm inaktiveeriti 20 min 70 °C juures.

qPCR viidi läbi reaktsioonisegus 0,5 µl cDNA-d + 0,2 µM F + 0,2 µM R praimerit (tabel 1) + 5 µl 2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo) mahus 10 µl kolme tehnilise kordusena (valmistatud ühise reaktsiooniseguna) 384 auguga plaadil (#B70515L, BIOplastics) ViiA7 Real-Time PCR System masinaga (Applied Biosystems), kasutades negatiivse kontrollina ilma cDNA-ta reaktsioonisegu ja referentsgeenina HPRT. Iga cDNA iga praimeripaari kolme tehnilise paralleeli tulemus keskmistati ning tulemus arvutati referentsgeeni suhtes $\Delta\Delta C_t$ meetodil. Andmete analüüsiks kasutati ViiA7 tarkvara ja MS Excel 2010.

2.2.9 3' RACE

Kahe WT ja kahe KO hiire splenotsüüdid viidi täielikku RPMI söötmesse, jagati 6 auguga koekultuuriplaadi (#657160, Greiner Bio-one) kahe augu vahel, millest ühele lisati 1 µg/ml LPS (Sigma) (teine jäi stimulatsioonita) ning inkubeeriti 48h 37 °C juures 5% CO₂

keskkonnas. Seejärel jagati iga proov veelkord kaheks osaks, millest üht lüüsi 0,5 ml TRIzol'iga (Invitrogen) RNA eraldamiseks ning teine osa Laemmli puhvris *western blot*'i jaoks. RNA eraldamine ja cDNA süntees viidi läbi nagu eelmises punktis, kasutades cDNA sünteesiks 1 µg RNA-d ja 1 µl 10 µM AP-dT praimerit (tabel 1). Saadud cDNA pealt teostati PCR praimeritega Sp140 ex5F + AUAP või HPRT F + AUAP (tabel 1) ning FirePol Taq polümeraasiga (Solis Biodyne; Ta 58 °C, elongatsioon 2 min, 32 tsüklit) ja PCR produktid lahutati 1% agarosgeelis 0,5 µg/ml etiidiumbromiidiga. Sekveneerimiseks puhastati geelist ~300 nt fragment välja (Nucleospin Gel and PCR Clean-Up, Macherey-Nagel), tõsteti TA-kloneerimisvektoris (InsTAclone PCR Cloning kit, Thermo), transformeeriti NovaXG kompetentidesse, kasvatati bakterikultuuris (LB + karbenitsilliin, 16h 37 °C), eraldati plasmiidne DNA (Nucleospin Plasmid QuickPure, Macherey-Nagel) ning sekveneeriti T7 praimeriga (TAATACGACTCACTATAGGG, Eesti Biokeskuse tuumiklabor).

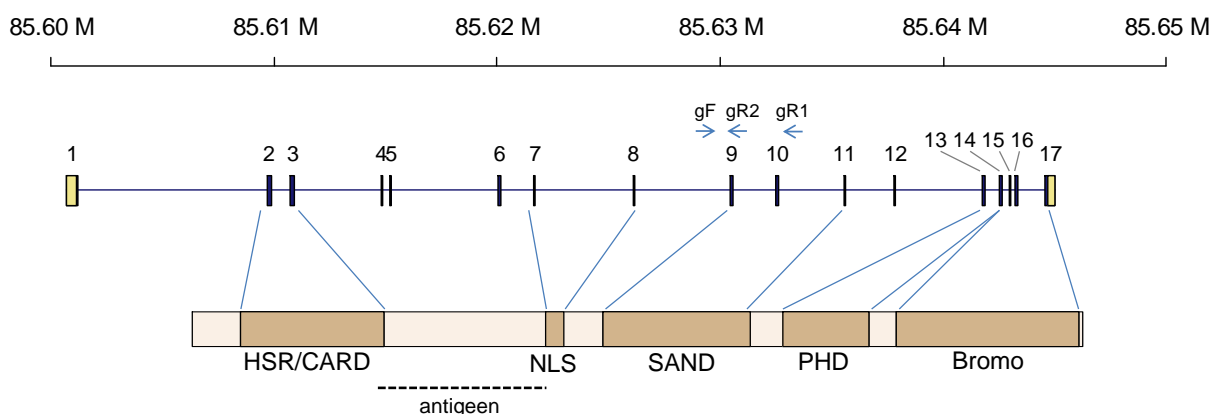
2.2.10 Western blot

Eelmises punktis kirjeldatud proovid, lisaks IFN γ -stimuleeritud splenotsüüdid (6-cm diameetriga koekultuuritassil 48h 2×10^3 U/ml rmIFN γ (ImmunoTools) juuresolekul 37 °C juures, 5% CO₂), YFP-ga või antud töös kloneeritud pFlag-Sp140 Δ 74-ga transfecteeritud HEK 293 rakud (10 cm koekultuuritassil, TurboFect (Thermo)) või rekombinantne antigeen kuumutati 1x Laemmli puhvris (2% SDS + 10% glütserool + 50 mM Tris pH 6,8 + 50 mM DTT + bromofenoolsinine) 5 min 95 °C juures ning lahutati SDS-polüakrüülamiidgeelis (0,1% SDS, 12% akrüülamiid (pH 8,8); eel-lahutus 5% geelis (pH 6,8)), kanti PVDF filtrile (Immobilon P, Sigma), blokeeriti 16 h 5% piimapulbriga TTBS (100 mM Tris pH 7,5 + 150 mM NaCl + 0,1% Tween-20) puhvris 4 °C juures, inkubeeriti toatemperatuuril 1 h primaarse antikehaga (5 ml hübridoomi söödet + 5 ml TTBS + 5% piimapulber), pesti 4x 5min TTBS-ga, inkubeeriti toatemperatuuril 1 h sekundaarse antikehaga α -mouse-IgG-HRP (#115-035-146, Jackson ImmunoResearch), pesti 4x 5min TTBS-ga, immutati 4 min substraadiga ECL Select (GE Healthcare) ning detekteeriti Image Quant RT ECL (GE Healthcare) abil.

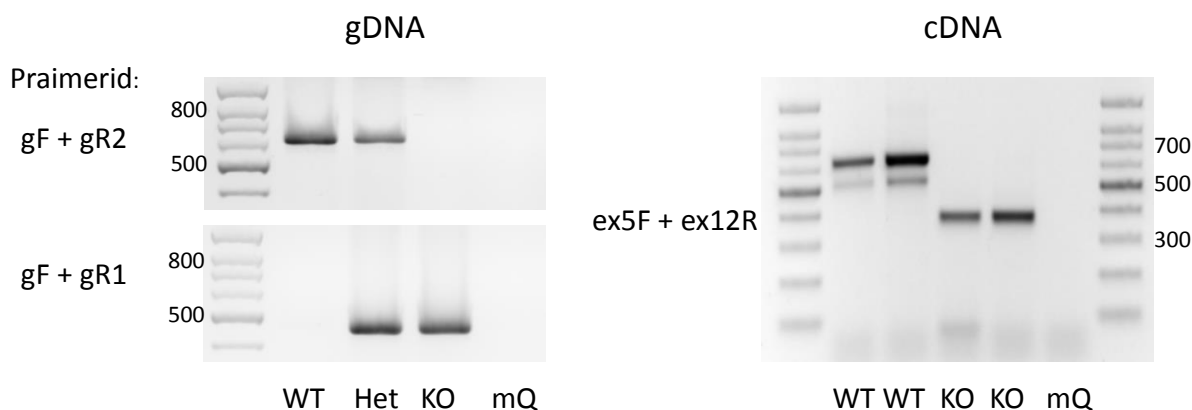
2.3 Tulemused

2.3.1 Deletsiooni mõju transkriptile

Analüüsitava Sp140 KO hiirtel on genoomist eemaldatud Sp140 geeni eksonid 9 ja 10 (Joonised 3 ja 4), mis kõrvaldavad SAND domeeni alguse. Splenotsüütide cDNA-le tehti PCR eksonitel 5 ja 12 asuvate praimeritega, et kinnitada deletsioon transkripti tasemel ning näha, kuidas see splaissimist mõjutab (Joonis 4).



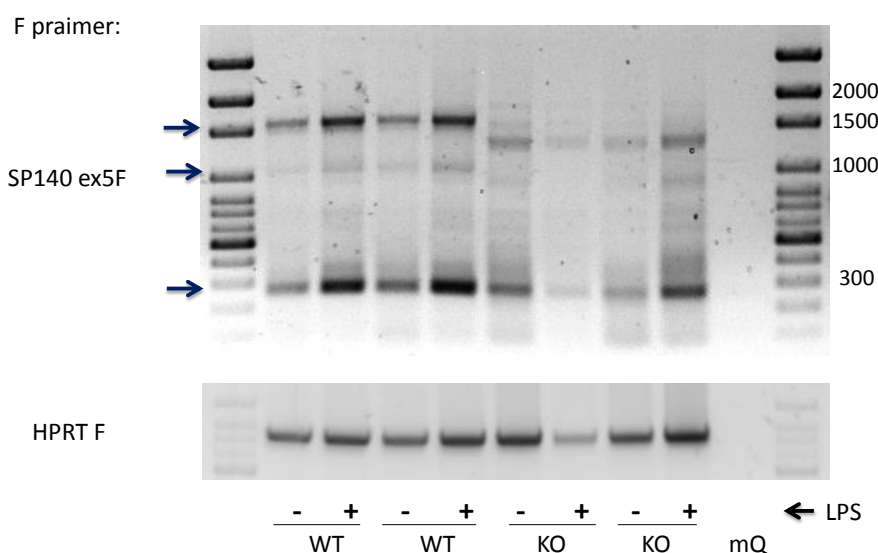
Joonis 3. Ülal toodud hiire Sp140 geeni eksonstruktuur koos kromosoom 1 genoomsete koordinaatidega, eksonite kohal märgitud genotüpiseerimisel kasutatud praimerite asukohad. All toodud täispika valgu domeenide asetus ning seos eksonitega, valgu all toodud antikehade tegemiseks kloneeritud antigeeni asukoht. M – megabaas, täispika transkripti eksonite koordinaadid GRCm38.p2 järgi. Domeenide nimetuste tähendused on seletatud tekstis.



Joonis 4. KO kinnitus PCR meetodil genoomselt DNA-lt (gDNA) ning splenotsüütide cDNA-lt (paremal). Oodatavad pikkused gF+gR2 korral: WT 617 nt, KO puudub; gF + gR1 korral: WT 3394 nt (ei amplifitseeru antud PCR tingimustel), KO 500 nt, ex5F + ex12R korral WT 625 nt, KO 377 nt. Praimerite asukohad toodud ka joonisel 3.

Selgus, et KO ekspresseerib transkripti ilma deleteeritud eksoniteta, kuid uuritavasse vahemikku jäävad teised eksonid on transkripti kaasatud (joonis 4, parempoolne paneel), mida kinnitati PCR produkti sekveneerimisel. Eksonite 9 ja 10 (vastavalt 105 ja 143 nt, kokku 248 nt) puudumine KO puhul tähendab, et transkript läheb deletsiooni järel raamist välja ning valk jõuab 27 aminohappe järel stoppkoodonini. Lisaks nähti WT puhul nõrgemalt ekspresseeritavat ~100 nt võrra lühemat varianti, mille puudumine KO korral lubab lihtsamal juhul (ühe eksoni väljasplaissimise korral) pikkuse järgi oletada ekson 9 osalist väljasplaissimist WT hiires, see aga vajaks katselist tõendust (joonis 4, parempoolne paneel).

Kõigil inimese Sp100 perekonna geenidel on näidatud mitmete isovormide olemasolu. Hiire Sp140 kohta on andmebaasides ainult täispikk variant ning lisaks on mõni 5' otsata fragment (Ensembl) või teadmata tõeväärtusega ennustused (NCBI Gene). Eksperimentaalsete andmete puudujäägi täitmiseks teostati splenotsüütide cDNA pealt 3' RACE (*rapid amplification of cDNA ends*), kasutades geenispetsiifilise praimerina eksonil 5 asuvat praimerit.

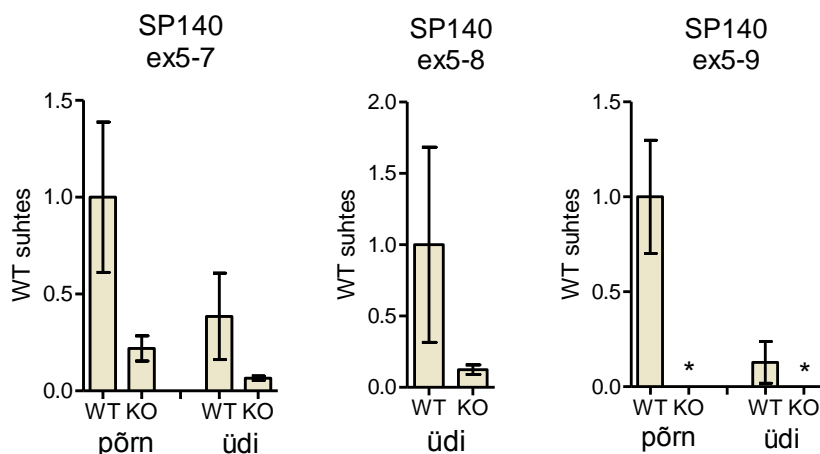


Joonis 5. Erinevate transkriptide olemasolu põrna rakkudes 3' RACE meetodil ning genotüübi ja *in vitro* LPS-stimulatsiooni mõju. Sisekontrollina HPRT (all). Nooltega tähistatud WT transkriptid, mida tekstis mainitakse.

Joonisel 5 on näha kahte tugevamat signaali, millest ülemise pikkus vastab täispika Sp140 pealt ennustatavale (~1550 nt, ekson 5 kuni 3'UTR + AP-dT praimer) ja nihkus KO korral eeldatava pikkuse võrra (248 nt) allapoole. Joonisel 5 olev ~300 nt fragment osutus sekveneerimisel eksoniga 7 lõppevaks isovormiks (lisa 2), mida praegu andmebaasides ei leidu. Viimase polü-A järjestusele eelnes mittekanooniline polü-A signaal AAGAAA (lisa 2), mis on nii hiirel kui inimesel lühendatud transkriptide polü-A signaalide hulgas kolme levinuma seas (Tian et al., 2005). Lisaks nähti nõrgemat ~1000 nt pikkust signaali (joonis 5),

mida pole veel iseloomustatud, aga mis KO puhul samuti nihkus. LPS stimulatsiooniga ja stimulatsioonita proovide võrdlusest tundub, et tõenäoliselt on hiire Sp140 tase splenotsüütides LPS poolt üles reguleeritav,

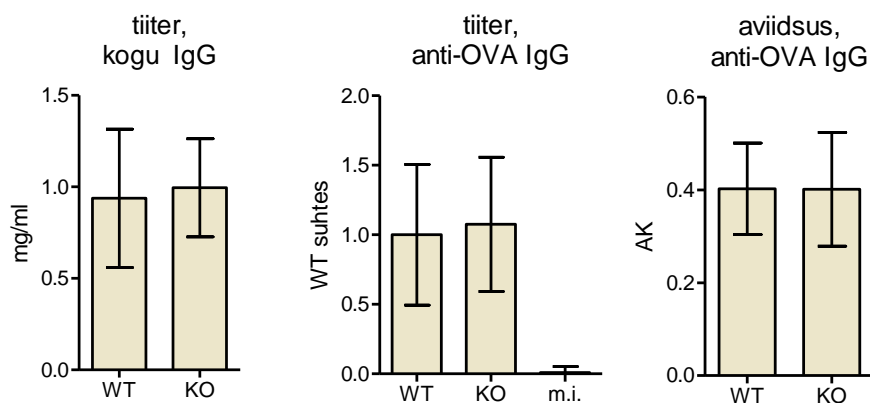
Kuna eksonite 9 ja 10 deletsioon viib transkripti raamist välja ning enneaegse stoppkoodoni tekkeni, peaksid KO pikemad transkriptid olema mõjutatavad *nonsense mediated decay* (NMD) poolt. Põrna cDNA-delt tehtud qPCR-i andmetel on KO splenotsüütides Sp140 ekspressiooni tase langenud nii eksonil 7 kui 8 asuva R praimer järgi (joonis 6). Viimane neist peaks esindama pikemate transkriptide oodatavat ekspressioonimuutust, eelmine aga (ekson 7 praimeriga) sisaldab ka RACE teel leitud lühema transkripti ekspressiooni. Jooniselt 5 tundub, et alumist transkripti on massilt (ja molaarselt) rohkem kui pikimat, mistõttu peaks eksonil 7 asuva praimeriga tehtud qPCR-ist järelduma ka lühema transkripti ekspressioonimuutus, mille põhjus on ebaselge.



Joonis 6. Eksonite 9-10 deletsiooni mõju Sp140 ekspressioonile. qPCR kolme erineva praimeripaariga (ex5-7, ex5-8 ja ex5-9) põrna või luuüdi rakkudest, toodud 2-kuuste hiirte (6 WT + 8 KO) keskmine ja 95% usalduspiirid. * korral polnud ekspressioon detekteeritav. Kõik kõrvuti olevad WT/KO erinevused on statistiliselt olulised (kahepoolne Mann-Whitney test).

2.3.2 SP140 KO hiire immuunrakkude fenotüübi uurimine

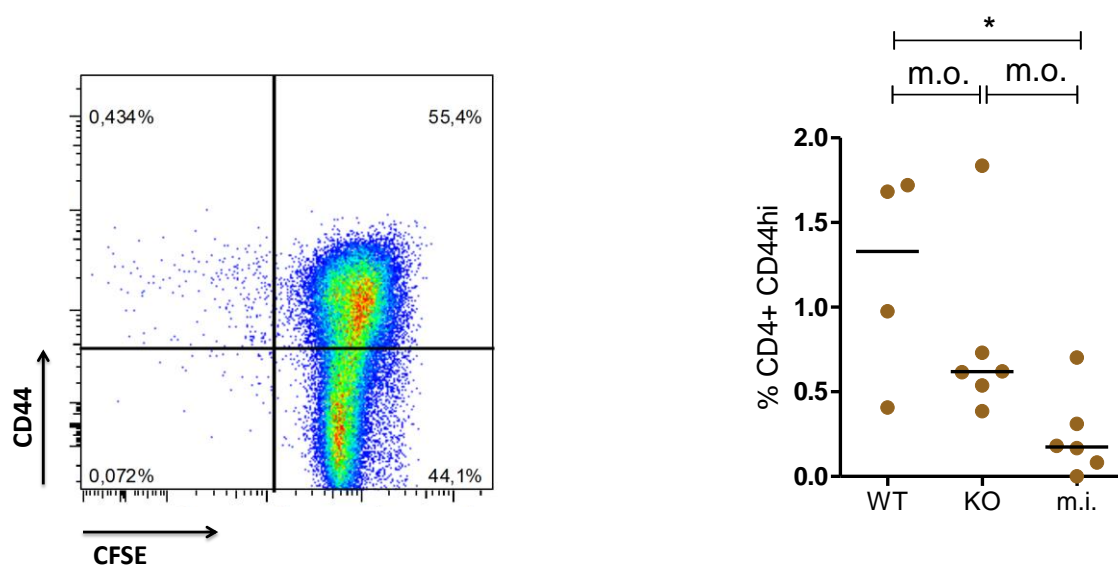
Lähtudes ekspressiooniandmetest, mille kohaselt on Sp140 ekspressioon kõige kõrgem B-rakkudes, on oluline uurida, kas Sp140 KO hiirtel on muutusi antikehade valmimises. Seerumist tehtud ELISA kogu IgG tasemes muutusi ei näidanud, samuti ei olnud immuniseeritud loomadel muutusi mudelantigeeni ovalbumiini vastaste IgG antikehade tasemes (Joonis 7).



Joonis 7. IgG antikehade üldine tase seerumis ning ovalbumiini vastaste IgG-de tase ning aviidsus ELISA meetodil. Kolm immuniseerimist kahe nädalaste intervallidega, katse on lõpetatud nädal pärast viimast süsti. Siin toodud tulemused pärinevad 12-kuuste hiirte katsegrupist. Näidatud 95% usalduspiirid. Anti-OVA IgG m.i. väärtused esindavad taustast tulenevat mõõtmispiiri. Kogu IgG analüüsi pole kaasatud ovalbumiin-mitteimmuniseeritud kontrolle. AK – aviidsuskoeffitsient, m.i. – mitteimmuniseeritud, OVA – ovalbumiin.

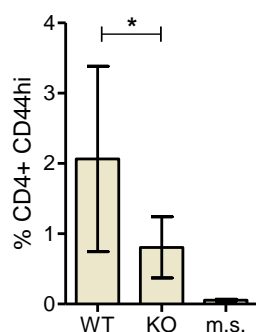
Arvestades, et ühe kõrgema ekspressiooniga rakutüüp on idutsentri B-rakk, kus toimub afiinsusküpsemine, tekib küsimus, kas võib olla erinevusi antikehade aviidsuses. Üks lihtsamaid meetodeid selle uurimiseks on ELISA modifikatsioon, kus enne detekteerimist elueeritakse antikehi kaotroopse soola keskkonnas plaadilt lahti ning mõõdetakse seejärel, kui suur osa antikehadest seotuks jäi; antikehade küpsemise käigus toimub mõõdetav aviidsuse kasv (lisa 3). Meie katse lõpus olid WT ja KO hiirte ovalbumiini vastaste IgG antikehade aviidsused ühesugused (joonis 7, parempoolne paneel), seega pole alust järeldada, et Sp140 valgu funktsioon hiires oleks seotud afiinsusküpsemisega.

Paralleelselt uuriti ka T-rakkude funktsiooni, täpsemalt immuniseerimise järel tekkivate antigeen-spetsiifiliste T-rakkude arvukust CFSE lahjenduse meetodil *in vitro* stimulatsioonis. Mõlema esitletava katsegrupi tulemused on sarnased – KO grupi arvud on üldiselt madalamad kui WT (joonis 8 ja lisa 4). Selle näitamist raskendab kummaski katses KO grupis olev erind (*outlier*), katsegruppide väiksus ning peamise raskusena WT vähene eristumine mitteimmuniseeritud kontrollist, mis viitab meetoodilisele probleemile. Mõlema grupi koos analüüsimist raskendab nende väärtuste asumine veidi erinevates piirkondades, aga kui kumbki grupp enne ühendamist katsegrupi immuniseeritud loomade (WT + KO) mediaani suhtes normaliseerida, võib ühendgrupi OVA-immuniseeritud loomade WT vs KO erinevus huvipakkuv olla ($p < 0,05$; ühepoolne Mann-Whitney *post-hoc* test). $CD4^+$ T-rakkude arvus samal ajal erinevust ei olnud.

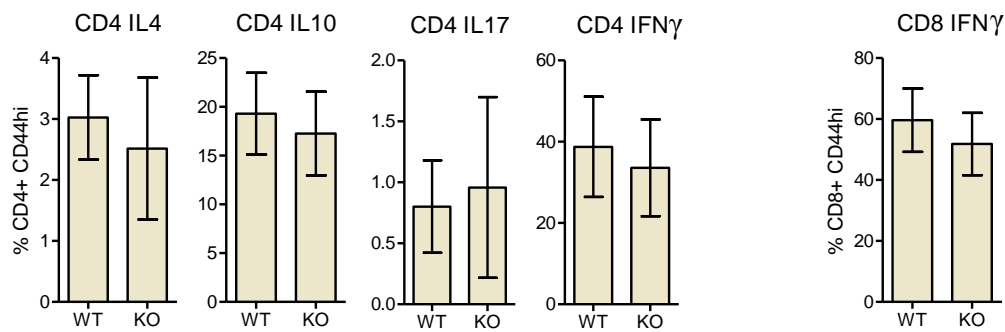


Joonis 8. Ovalbumiini spetsiifiliste CD4⁺ T-rakkude määramine CFSE-lahjenduse meetodil. Vasakul toodud esindav pilt voolutsütomeetrilisest analüüsist, paremal CFSE^{lo} CD44^{hi} rakkude osakaal CD44^{hi} CD4⁺ splenotsüütidest ovalbumiin-immuniseeritud 4-kuustes hiirtes. Näidatud mediaan ja Kruskal-Wallise test Dunni mitmese järeltestiga. m.i. – mitteimmuniseeritud, m.o. – statistiliselt mitteoluline, * – $p < 0,05$.

Esimeses grupis (4-kuused) kasutati antigeeni-spetsiifiliste T-rakkude määramiseks alternatiivse meetodina IL-4 sisemärgimist 16 h OVA-stimulatsiooni järel, mis andis sarnase tulemuse, kuid veel väiksema erinevusega WT ja mitteimmuniseeritud kontrolli vahel (andmeid pole toodud). Samas katses kasutati IL-4 määramise positiivse kontrollina PMA-ionomütsiin stimulatsiooni, mis see-eest tundus KO ja WT vahel erinev (joonis 9), seetõttu korraldati järgmises grupis tsütokiinide tootmise katset rohkemate sihtmärkide peal erinevate T-raku alatüüpides, kus olulisi erinevusi ei ilmnenu (joonis 10).



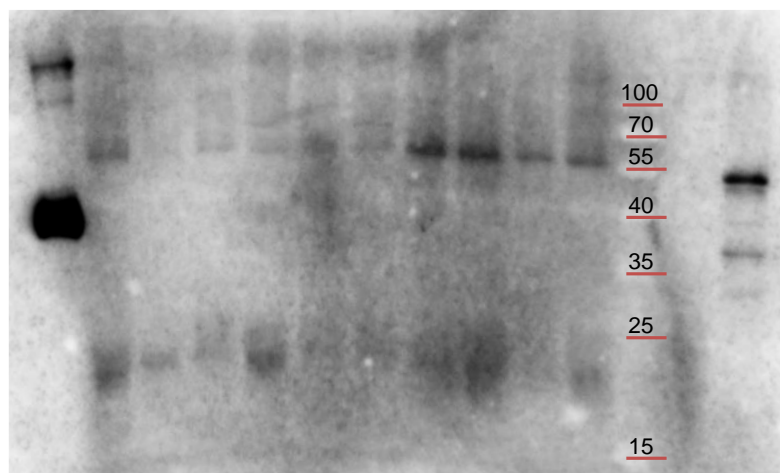
Joonis 9. CD4⁺ T-rakkude võime PMA-ionomütsiin stimulatsioonis IL-4 toota. Toodud 4-kuuste hiirte splenotsüütides IL-4⁺ rakkude osakaal CD44-kõrgetest CD4⁺ rakkudest ning selle 95% usalduspiirid. Ovalbumiin-mitteimmuniseeritud kontrollle pole analüüsi kaasatud. * – $p < 0,05$ (kahepoolne t-test), m.s. – mittestimuleeritud.



Joonis 10. T-rakkude võime PMA-ionomütsiin stimuleerimisel erinevaid tsütokiine toota. Joonisel on toodud 12-kuuste hiirte splenotsüütides tsütokiin-positiivsete rakkude osakaal CD44^{hi} CD4⁺ või CD8⁺ rakkudest ning selle 95% usalduspiirid. Ovalbumiin-mitteimmuniseeritud kontrolle ei ole analüüsi kaasatud.

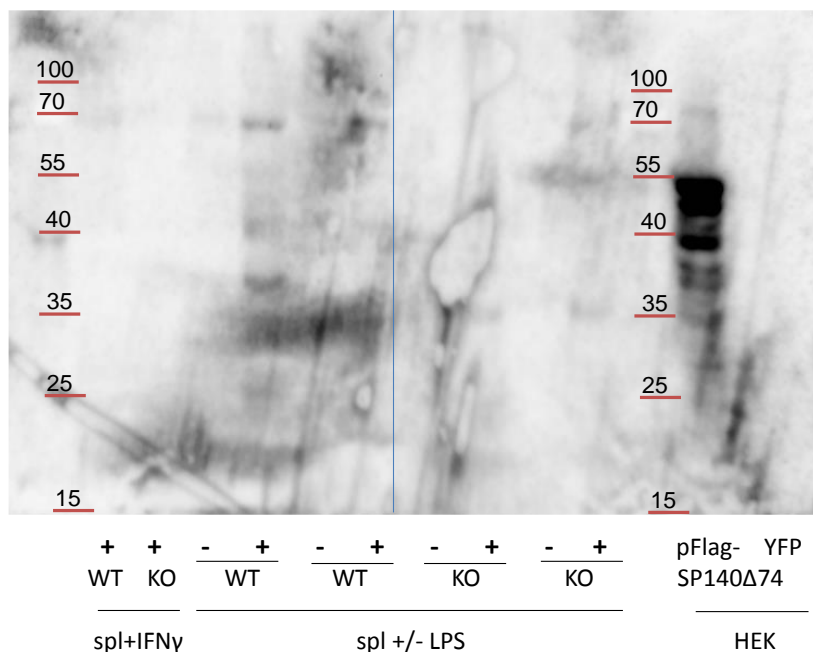
2.3.3 Monoklonaalsete antikehade valmistamine

Joonisele 3 märgitud Sp140 aminohappeid 109-215 kodeeriv fragment kloneeriti ning immuniseerimiseks kasutati sellelt ekspresseeritud GST-Ag109-215 liitvalku (immuniseerimine ja eeltestimine ELISA-ga on teostatud Erkki Juroneni poolt). Tulemusena saadud kahe kandidaathübridoomi testimine *western blotis* on toodud joonistel 11 ja 12.



	+ +		- +		- +		- +		pFlag-	
	WT	KO	WT	WT	WT	KO	KO	KO	YFP	SP140Δ74
GST-										
Ag.	spl+IFNγ		spl +/- LPS						HEK	

Joonis 11. Monoklonaalse antikeha 1D2 reaktiivsus *western blotis*. Proovidena on kasutatud immuniseerimiseks tehtud antigeen (GST-Ag109-215, 20 ng, eeldatav suurus 38 kDa), IFN γ - või LPS-stimuleeritud splenotsüüdid (spl, geelil eeldatavalt 10⁶ rakku, eeldatav täispikk WT SP140 63 kDa, KO 31 kDa) ning HEK 293 rakkudes üleekspresseeritud hiire SP140Δ74 koos YFP-kontrolliga (pFlag-SP140, geelil ~10⁶ rakku, konstrukti eeldatav suurus 50 kDa). LPS-stimuleeritud materjal on samast katsest kui joonisel 4 toodu. Sisekontrolli järgi on HEK radadel ühepalju materjali ja IFN γ -stimuleeritud KO rajal vähem kui WT omal (histoon H3, pole toodud).



Joonis 12. Monoklonaalse antikeha 8B6 reaktiivsus *western blotis*. Proovid on enamuses samad, mis joonisel 11. Radade piiride jälgimiseks lisatud eraldusjoon.

Antikeha 1D2 suutis edukalt ära tunda immuniseerimiseks kasutatud GST-Ag109-215 ning HEK 293 rakkudes üleekspresseeritud peaaegu täispikka hiire SP140 (valgust on puudu viimase kolme eksoni osa), mis andis ootuspärase signaali 50 kDa juures. Hiire splenotsüütides oli näha signaali 55 kDa ja 20-25 kDa juures, mille päritolu on teadmata.

Antikehal 8B6 ei tekkinud 55 kDa ega 20-25 kDa juures signaali, see-eest oli näha LPS-stimulatsioonile reageeriv veidi alla 70 kDa valk, mis vastab ligikaudu täispika Sp140 valgu ennustatavale massile (65 kDa). Lähemal vaatlemisel näeb seda valku väga õrnalt ka esimese antikeha WT LPS-stimulatsiooniga proovides. Samal ajal oli KO rajal näha nõrk stimulatsioonile alluv 35 kDa valk, mis vastab ligikaudu KO ennustatavale geeniproduktile (31 kDa).

2.4 Arutelu

Genoomselt ja cDNA materjalilt tehtud PCR-id kinnitavad, et meil on KO hiire Sp140 geeni eksonitest 9 ja 10 ning pikimat transkripti ekspresseeritakse ilma nende eksoniteta ja teiste eksonite splaissimist mõjutamata. Lisaks mõjutab deletsioon 3' RACE tulemuste andmetel veel vähemalt ühte lühemat transkripti, mille eksonstruktuuri pole veel iseloomustatud. Kuna ekson 10 kaotus viib transkripti raamist välja, laieneb KO mõiste ka edasistele eksonitele ehk valgust puuduvad SAND, PHD ja Bromodomeen. Lisaks nägime lühemat eksoniga 7 lõppevat

transkripti, mis ulatuse poolest meenutab inimese Sp100 perekonna geenidel kirjeldatud CARD ja SAND domeenide vahel lõppevaid isovorme. Nondest erineb siin leitud transkript (edaspidi lühiduse huvides mSP140alt) stoppkoodoni puudumise poolest ja valguks jõudmine on ilmselt *non-stop decay* poolt raskendatud. Ülejäänud joonistel 4 ja 5 nähtavad transkriptid vajavad veel lähemat uurimist. Väärib märkimist, et praegused isovormid jõuavad vaatevälja eksonil 5 asuva spetsiifilise praimeril abil, kuna see võimaldab piirata amplifitseeritavaid sihtmärke ainult Sp140 geeni pealt kodeeritavatele, kuid samas ei võimalda see näha veel lühemaid transkripte.

Lisaks viitavad RACE tulemused, et tõenäoliselt on hiire Sp140 tase LPS poolt üles reguleeritav, kuigi välistada ei saa ka osade rakkude proliferatsioonist LPS-stimulatsiooni tagajärjel. Sp140 promootoril olevad ennustatavad NF- κ B, AP-1 ja tüüp I interferoonide poolt reguleeritavad alad on LPS-stimulatsiooni poolt käivitavate signaalradade teadaolevad toimekohad (Lu et al., 2008), mis samuti lubab ennustada Sp140 ekspressiooni LPS-indutseeritavust.

qPCR järgi oli KO põrna ja luuüdi rakkudes Sp140 tase vähenenud ning võimalik, et mõjutatud on nii pikemad kui lühemad isovormid.

Hoolimata Sp140 teadaolevast kõrge tasemest B-rakkudes ei näinud me siin toodud katsegruppides KO puhul muutust seerumi antikehade üldises tasemes ega spetsiifilise antigeeni (ovalbumiini) vastaste IgG antikehade tasemes. Ei ole siiski välistatud, et efekt võib paremini ilmuda teiste isotüüpide või kindlate subklasside puhul. Kuna teadaolevalt on idutsentri B-rakud ühed kõrgemad Sp140 ekspresseerijad, uuriti KO mõju afiinsusküpsemisele, kuid tulemus oli negatiivne. Kuna lisaks isotüübivahetusele ja afiinsusküpsemisele toimub idutsentris (või ka varem, perifollikulaarsest B-rakust) mälu B-rakkude teke (Goodnow et al., 2010), milles on Sp140 ekspressioon teadaolevalt kõrgeim nii hiires kui inimeses, võib Sp140 olla oluline immunoloogilise mälu kujunemisel, kuid selle uurimine vajaks teistsugust katseskeemi.

Kahe grupi üldistusena võib väita, et antigeeni-spetsiifiliste CD4⁺ T-rakkude arvukus tundub KO puhul madalam, kuid selle korralikuks näitamiseks on peamiseks raskuseks meetodilised probleemid, millele viitab liiga väike erinevus positiivse ja negatiivse kontrolli (vastavalt WT ja mitteimmuniseeritud grupi) vahel. Praeguse meetodi puhul oleks võimalik optimeerida näiteks märgistamiseks kasutatavat CFSE kogust (mis on kõrgemas kontsentratsioonis rakkudele toksiline), lisada kultuurile söötme vahetamise etapp, optimeerida rakkude tihedust

koekultuuris ning kasutada voolutsütomeetrilises analüüsis elulemusvärvingut (*viability stain*). Samas võib kaaluda ka alternatiivseid meetodeid stimulandi (valk vs peptiid) või mõõdetava väljundi osas. Juhul, kui antigeeni-spetsiifiliste T-rakkude arvukuse muutus KO korral korratavaks osutub, jääb ikkagi lahtiseks, kas põhjus on T-rakkudes endis või antigeeni presenteerivates rakkudes.

Polükloonaalse PMA-ionomütsiin stimulatsiooni tulemustes oli gruppide vahel mõningane vastuolu, 4-kuustel hiirtel oli IL-4 tootmine KO CD4⁺ T-rakkudes vähenenud, 12-kuustel oluliselt mitte. Inimese rakkudel tehtud töödest on viiteid, et Sp140 üleekspressioon võimendab tsütokiinide IL-10, IL-17, ja IFN γ tootmist T-rakus ja vastupidi, siRNA *knockdown* vähendab IL-17 ja IFN γ tootmist (patent WO2012069525). Pole välistatud, et 12-kuused hiired pole selle katse jaoks optimaalsed ning sama tasuks korrata noorema katsegrupi peal.

Hiire SP140 vastaste monoklonaalsete antikehade loomise käigus saadi kahe kandidaathübriidoomi supernatandid, mida siin testiti *western blotis*. Mõlemad olid võimelised ära tundma immuniseerimiseks kasutatud fragmenti või HEK 293 rakkudes üleekspressseeritud SP140 lühendatud valku. Hiire splenotsüütidest pärinevas valgumaterjalis detekteeris üks antikeha rohkemaid sihtmärke kui teine, mis võib esindada ristreaktiivsust kõrvaliste sihtmärkidega. Teise võimalusena võib vähemalt osade sihtmärkide näol tegemist olla SP140 geenilt või tema fragmenti sisaldavalt piirkonnalt pärineva variandiga, mis kõiki eksoneid ei sisalda. Juhul, kui antikehade epitoobid asuvad Sp140 erinevatel eksonitel, oleks selline antikehade erinev reaktiivsus võimalik.

Antikehade tegemiseks kasutatud Sp140 fragment sisaldub täies ulatuses mSP140alt transkriptis ning joonisel 12 toodud antikeha 8B6, millele tehti niigi pikem ilmutus, ei näidanud mSP140alt pealt ennustatava valguprodukti ~24 kDa signaali. See toetab oletust, et sellelt transkriptilt on valgu tootmine *non-.stop decay* poolt takistatud.

Lisaks erineva reaktiivsusega signaalidele tundus, et oodatava suurusega valgud võivad isegi detekteeritavad olla, aga üldiselt on SP140 valgu ekspressioon põrna segapopulatsioonis liiga madal, st. kõrgelt ekspresseerivaid rakutüüpe, näiteks idutsentri või mälu-B rakke, võib olla liiga vähe. Natuke võiks olla abi geelile kantava lüsaadi hulga tõstmisest. Igal juhul ei piisa praegustest tulemustest, et KO signaali puudumist valgu tasemel kinnitada, mis vajab edasist tööd. Samuti oleks tulevikus vaja saadud antikehasid valideerida ka muudes rakendustes peale *western bloti*.

Asjaolu, et KO on loodud 129S6 rakuliinis ning ristatud lõpuks B6 taustale, tingib olukorra, kus fenotüübi otsimine praegusel taustal on ohustatud geneetilisest taustast tulenevate artefaktide poolt. Siin kasutatav katsegruppide moodustamine pesakonnakaaslastest lahendab osa probleemist, aga Sp140 geeni lähiümbrus hiires on tavapärasest rohkem mõjutatav nn *flanking gene effect* poolt ning töö jätkamiseks oleks vaja katseid teha puhtal 129S6 taustal.

Kokkuvõte

Oleme mitme erineva meetodiga jõudnud järeldusele, et meil on olemas hiireliin, kellel on deletsioon Sp140 geeni üheksandast ja kümnendast eksonist, mis valgu puhul vastab SAND domeeni puudumisele. Sp140 ja tema lähiümbruse saadaoleva genoomse järjestuse põhjal on deletsioon klassikalises Sp140 geenis, mitte korduspiirkonnas olevas geenifragmendis. KO hiire splenotsüütides ekspresseeritakse täispikka transkripti ilma deleteeritud eksoniteta, kuid teised naabereksonid on transkripti kaasatud, seega deletsioon naabereksonite splaissimist ei mõjuta. Deletsiooniga kaasneb lugemisraami nihe, mis vähemalt täispika transkripti puhul tähendab ka ülejäänud eksonite poolt kodeeritava valguosa kaotust. Lisaks nägime üht seitsmenda eksoniga lõppevat isovormi ja veel mitut alternatiivset transkripti, mida pole veel iseloomustatud. KO hiire põrna ja luuüdi rakkudes tuvastasime Sp140 ekspressioonitaseme vähenemise.

Lähtudes Sp140 kõrgeast ekspressioonitasemest erinevates B-raku alatüüpides, uurisime geeni defekti mõju IgG antikehade kogutasemele ning mudelantigeeni (ovalbumiini) vastaste antikehade tiitrile, kuid kummalgi juhul polnud KO hiirel muutusi. Samuti polnud muutust ovalbumiini vastaste antikehade aviidsuses. Antigeeni-spetsiifiliste T-rakkude arvukuses seevastu tundus mitmel katsegrupil WT ja KO vahel mõningane erinevus olevat, aga sel katsel oli meetoodilisi probleeme, mis vajab edasist tööd. Ühel katsegrupil nähti genotüübi mõju T-raku võimele IL-4 toota, mida korduskatse ei kinnitanud.

Töö käigus loodi hiire Sp140 valgu vastased monoklonaalsed antikehad, millest kahte hübriidoomi testiti siin *western blotis* ning mõlemad olid võimelised detekteerima antigeenina kasutatud Sp140 fragmenti või HEK 293 rakkudes üle ekspresseeritud Sp140 valku. Hiire splenotsüütide suhtes ilmutasid antikehad erinevat reaktiivsust praegu teadmata sihtmärkide suhtes, mis vajab lähemat uurimist. Võimalik signaal endogeenselt Sp140 valgult oli liiga nõrk, et KO valgu tasemel kinnitada.

Studies on mouse Sp140 gene

Uku Hämarik

Summary

Sp100 gene family is present in many mammalian genomes as a common gene cluster comprising Sp110, Sp140 and Sp100. All members of the family encode proteins with common domains, HSR/CARD, SAND, PHD and Bromodomain. The last three predict involvement in chromatin-templated processes such as transcriptional regulation, replication or DNA damage response. All aforementioned proteins localize in the nucleus in various nuclear dots that occasionally but not always overlap with PML bodies.

Expression patterns of the Sp100 family genes vary but some are highly expressed in immune cells, the main target of this work, Sp140, displays highest expression in B cells, but also in monocyte/macrophage lineage, T cells and NK cells. All members are interferon-inducible, which further supports their function in immune response. Several members have been described as interacting partners of viral proteins to various outcomes. Importantly, GWAS studies have linked polymorphisms in SP140 gene with risk of developing Crohn's disease, chronic lymphocytic leukaemia and multiple sclerosis.

The functions and mechanisms of these genes are elusive and require more detailed enquiry. Thus we have selected Sp140 gene as our primary target and set out to study its function in a mouse knockout. The gene cluster of the corresponding gene family is not an easy target to study in mouse, due to a highly amplified region directly adjacent to this cluster that contains many fragments of the genes in question. To our knowledge the repeat region does not contain full-length copies of Sp140.

In this Master's thesis we begin preliminary characterisation of a mouse KO of Sp140 SAND domain. We study how the deletion affects the composition and expression of the transcript. Further, we begin first experiments to study how the defect affects T cell and B cell function. Finally, we develop monoclonal antibodies to mouse Sp140.

Kasutatud kirjandus

Agulnik, S., Plass, C., Traut, W. and Winking, H. (1993). Evolution of a long-range repeat family in chromosome 1 of the genus *Mus*. *Mamm. Genome* 4: 704–10.

Bloch, D. B., Chiche, J. D., Orth, D., de la Monte, S. M., Rosenzweig, A. and Bloch, K. D. (1999). Structural and functional heterogeneity of nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4423–30.

Bloch, D. B., de la Monte, S. M., Guigaouri, P., Filippov, A. and Bloch, K. D. (1996). Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J. Biol. Chem.* 271: 29198–204.

Bloch, D. B., Nakajima, A., Gulick, T., Chiche, J. D., Orth, D., de La Monte, S. M. and Bloch, K. D. (2000). Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6138–46.

Bottomley, M. J., Collard, M. W., Huggenvik, J. I., Liu, Z., Gibson, T. J. and Sattler, M. (2001). The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat. Struct. Biol.* 8: 626–33.

Carracedo, A., Ito, K. and Pandolfi, P. P. (2011). The nuclear bodies inside out: PML conquers the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*

Dent, A. L., Yewdell, J., Puvion-Dutilleul, F., Koken, M. H., de The, H. and Staudt, L. M. (1996). LYSP100-associated nuclear domains (LANDs): description of a new class of subnuclear structures and their relationship to PML nuclear bodies. *Blood* 88: 1423–6.

Di Bernardo, M. C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., ... Houlston, R. S. (2008). A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 40: 1204–10.

Everett, R. D. and Chelbi-Alix, M. K. (n.d.). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89: 819–30.

Ferguson, B. J., Alexander, C., Rossi, S. W., Liiv, I., Rebane, A., Worth, C. L., ... Rich, T. (2008). AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J. Biol. Chem.* 283: 1723–31.

Franke, A., McGovern, D. P. B., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T., ... Parkes, M. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42: 1118–25.

Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G., Randall, K. L., Mackay, F. and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat. Immunol.* 11: 681–8.

Granito, A., Yang, W.-H., Muratori, L., Lim, M. J., Nakajima, A., Ferri, S., ... Muratori, P. (2010). PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* 105: 125–31.

- Grötzinger, T., Jensen, K. and Will, H. (1996). The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN-gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility. *J. Biol. Chem.* 271: 25253–60.
- Guldner, H. H., Szostecki, C., Grötzinger, T. and Will, H. (1992). IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J. Immunol.* 149: 4067–73.
- Guldner, H. H., Szostecki, C., Schröder, P., Matschl, U., Jensen, K., Lüders, C., ... Sternsdorf, T. (1999). Splice variants of the nuclear dot-associated Sp100 protein contain homologies to HMG-1 and a human nuclear phosphoprotein-box motif. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 5: 733–47.
- Isaac, A., Wilcox, K. W. and Taylor, J. L. (2006). SP100B, a repressor of gene expression preferentially binds to DNA with unmethylated CpGs. *J. Cell. Biochem.* 98: 1106–22.
- Ishov, A. M. and Maul, G. G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J. Cell Biol.* 134: 815–26.
- Kadereit, S., Gewert, D. R., Galabru, J., Hovanessian, A. G. and Meurs, E. F. (1993). Molecular cloning of two new interferon-induced, highly related nuclear phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* 268: 24432–41.
- Kunze, B., Weichenhan, D., Virks, P., Traut, W. and Winking, H. (1996). Copy numbers of a clustered long-range repeat determine C-band staining. *Cytogenet. Cell Genet.* 73: 86–91.
- Lallemand-Breitenbach, V. and de Thé, H. (2010). PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a000661.
- Lehming, N., Le Saux, A., Schüller, J. and Ptashne, M. (1998). Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 7322–6.
- Ling, P. D., Peng, R. S., Nakajima, A., Yu, J. H., Tan, J., Moses, S. M., ... Bloch, D. B. (2005). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 24: 3565–75.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. and Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145–51.
- Madani, N., Millette, R., Platt, E. J., Marin, M., Kozak, S. L., Bloch, D. B. and Kabat, D. (2002). Implication of the lymphocyte-specific nuclear body protein Sp140 in an innate response to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 76: 11133–8.
- Negorev, D. G., Vladimirova, O. V., Ivanov, A., Rauscher, F. and Maul, G. G. (2006). Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression. *J. Virol.* 80: 8019–29.
- Negorev, D., Ishov, A. M. and Maul, G. G. (2001). Evidence for separate ND10-binding and homo-oligomerization domains of Sp100. *J. Cell Sci.* 114: 59–68.
- Nicewonger, J., Suck, G., Bloch, D. and Swaminathan, S. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) SM protein induces and recruits cellular Sp110b to stabilize mRNAs and enhance EBV lytic gene expression. *J. Virol.* 78: 9412–22.

- Org, T., Chignola, F., Hetényi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., ... Peterson, P. (2008). The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep.* 9: 370–6.
- Pan, H., Yan, B.-S., Rojas, M., Shebzukhov, Y. V., Zhou, H., Kobzik, L., ... Kramnik, I. (2005). Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* 434: 767–72.
- Roscioli, T., Cliffe, S. T., Bloch, D. B., Bell, C. G., Mullan, G., Taylor, P. J., ... Buckley, M. F. (2006). Mutations in the gene encoding the PML nuclear body protein Sp110 are associated with immunodeficiency and hepatic veno-occlusive disease. *Nat. Genet.* 38: 620–2.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., ... Compston, A. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476: 214–9.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C. and Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 7316–21.
- Sillé, F. C. M., Thomas, R., Smith, M. T., Conde, L. and Skibola, C. F. (2012). Post-GWAS functional characterization of susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 7: e29632.
- Surdo, P. Lo, Bottomley, M. J., Sattler, M. and Scheffzek, K. (2003). Crystal structure and nuclear magnetic resonance analyses of the SAND domain from glucocorticoid modulatory element binding protein-1 reveals deoxyribonucleic acid and zinc binding regions. *Mol. Endocrinol.* 17: 1283–95.
- Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A. N., Walsh, M. J. and Zhou, M.-M. (2010). Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* 466: 258–62.
- Zhao, K., Lu, Z.-X., Park, J. W., Zhou, Q. and Xing, Y. (2013). GLiMMPS: Robust statistical model for regulatory variation of alternative splicing using RNA-seq data. *Genome Biol.* 14: R74.
- Zucchelli, C., Tamburri, S., Quilici, G., Palagano, E., Berardi, A., Saare, M., ... Musco, G. (2014). Structure of human Sp140 PHD finger: an atypical fold interacting with Pin1. *FEBS J.* 281: 216–31.
- Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D. and Patel, D. J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 1025–40.
- Tian, B., Hu, J., Zhang, H. and Lutz, C. S. (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.* 33: 201–12.
- Traut, W., Rahn, I. M., Winking, H., Kunze, B. and Weichenhan, D. (2001). Evolution of a 6-200 Mb long-range repeat cluster in the genus *Mus*. *Chromosoma* 110: 247–52.
- Traut, W., Weichenhan, D., Eickhoff, U. and Winking, H. (1999). Origin of the chromosome 1 HSR of the house mouse detected by CGH. *Chromosome Res.* 7: 649–53.

- Traut, W., Winking, H. and Adolph, S. (1984). An extra segment in chromosome 1 of wild *Mus musculus*: a C-band positive homogeneously staining region. *Cytogenet. Cell Genet.* 38: 290–7.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–62.
- Weichenhan, D., Kunze, B., Traut, W. and Winking, H. (1998). Evolution by fusion and amplification: the murine Sp100-rs gene cluster. *Cytogenet. Cell Genet.* 80: 226–31.
- Weichenhan, D., Kunze, B., Winking, H., van Geel, M., Osoegawa, K., de Jong, P. J. and Traut, W. (2001). Source and component genes of a 6-200 Mb gene cluster in the house mouse. *Mamm. Genome* 12: 590–4.
- Weith, A., Winking, H., Brackmann, B., Boldyreff, B. and Traut, W. (1987). Microclones from a mouse germ line HSR detect amplification and complex rearrangements of DNA sequences. *EMBO J.* 6: 1295–300.
- Winking, H., Bostelmann, H. and Fredga, K. (1991). Incidence of double-band HSRs in chromosome 1 of the house mouse, *Mus musculus musculus*, from Oland (Sweden): a population study. *Hereditas* 114: 111–6.

Tänuõnad

Suurimad tänud juhendajatele eesotsas Mario Saarega, kes nõu ja jõuga abiks olid ning laborikaaslastele, keda kõiki ei jõua üles lugeda. Tänan ka seniseid õppejõude alusteadmiste jagamise eest magistriõpingute jooksul. Lisaks tahan tänada hiiri meeldiva koostöö eest.

Kasutatud veebiadressid ja programmid

<http://www.ensembl.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

<http://www.ebi.ac.uk/ena/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.genevestigator.com/gv/biomed.jsp>

<http://www.immgen.org/databrowser/index.html>

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

Veebiadressid kasutatud seisuga 25.05.14

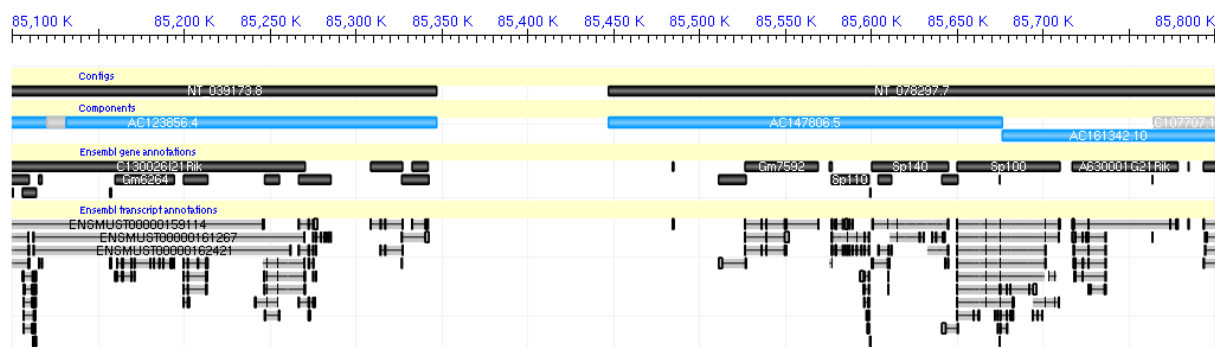
Sekveneerimisandmed analüüsiti programmis BioEdit 7.1.3.

Voolutsütomeetriliste andmete analüüsiks kasutati programmi FlowJo 7.5 (TreeStar Inc).

Statistilised analüüsid teostati programmis GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc).

Graafikute tegemiseks kasutati programme GraphPad Prism 5 ning Microsoft PowerPoint 2010.

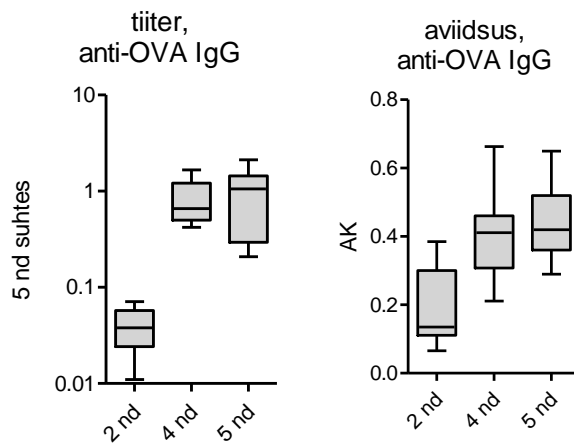
Lisad



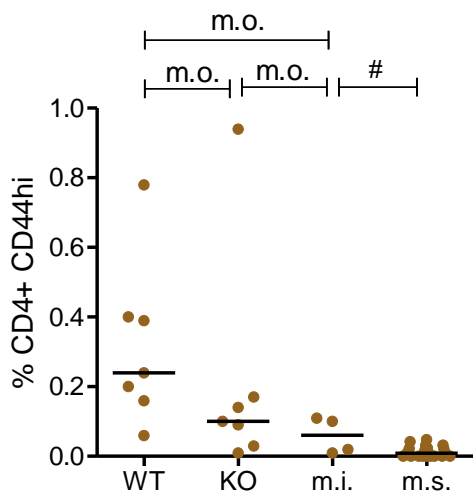
Lisa 1. Hiire kromosoom 1 Sp140 lookuse ümbruses NCBI andmebaasis, tähelepanu pöörata joonise keskel asuvalle lüngale genoomes järjestuses (CloneFinder vaates 10.05.2014 seisuga, genoomi versioon GRCm38.p1). Detailid paremini vaadatavad töö elektroonilises versioonis.

SP140 AAGAAAACCCAAGAAGCAGAGAAGAAAAAAGAAAGGCCACAACCTGGTCAA
A.A..A.....AGTACTAGTCGACGCGTGGC
A.A..A.....AGTACTAGTCGACGCGTGGC
A.A..A.....AGTACTAGTCGACGCGTGGC
A.A..A.....A.GTACTAGTCGACGCGTGG
A.A..A.....A..GTACTAGTCGACGCGTG
A.A..A.....A...GTACTAGTCGACGCGT
A.A.....A...AAGTACTAGTCGACGC
A.....A...AAAAGTACTAGTCGAC
A.....A...AAAAAGTACTAGTCG
 SP140 AAGAAAACCCAAGAAGCAGAGAAGAAAAAAGAAAGGCCACAACCTGGTCAA
 ..ekson7...>ekson8

Lisa 2. TA-kloneeritud 3'RACE alumise bändi sekveneerimise joondus SP140-ga, sekveneeriti mitu kloon. All märgitud eksoni8 algus, punktiga tähistatud SP140-ga joonduvad positsioonid, muud nukleotiid välja kirjutatud. Paremal halliga märgitud RACE PCR praimer (AUAP) osa, keskel värviliselt cDNA sünteesi praimer (AP-dT) algus eeldusel et praimeril on 17 T-nukleotiidi. Kollaselt tähistatud positsioonid (A asemel SP140-ga joonduv nukleotiid) näitavad, et osad praimerid on lühemad kui tellitud või toimub lühenemine PCR või kloneerimise käigus. Vasakul punasega märgitud alternatiivne polü-A signaal AAGAAA.



Lisa 3. Ovalbumiini vastaste IgG-de tase ja aviidsus ELISA meetodil 12-kuustes hiirtes. Immuniseerimised ajapunktides 0, 2, 4 nädalat (nd), vereproovid viimaste immuniseerimiste ajal ning katse lõppedes (5 nd). Kujutatud 25/50/75 kvartiilid koos miinimumi ja maksimumiga. AK – aviidsuskoeffitsient, OVA – ovalbumiin.



Lisa 4. Ovalbumiini spetsiifiliste CD4+ T-rakkude määramine CFSE-lahjenduse meetodil (nagu joonisel 8). Toodud CFSE-madalate osakaal CD44-kõrgetest CD4+ splenotsüütidest ovalbumiin-immuniseeritud 12-kuustes hiirtes. Näidatud mediaan ja WT/KO/m.i. vahel Kruskal-Wallise test Dunni mitmese järeltestiga, m.i./m.s. vahel ühepoolne Mann-Whitney test. m.i. – mitteimmuniseeritud, m.o. – statistiliselt mitteoluline, m.s. – mittestimuleeritud, # – $p < 0,05$.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Uku Hämarik (sünnikuupäev: 21.03.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Uurimus hiire Sp140 geenist

mille juhendajad on Mario Saare ja Tambet Tõnissoo

- 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014